

保健食品功能检验与评价方法（2023 年版）

适用范围

1 保健功能检验与评价应符合《保健食品功能检验与评价技术指导原则（2023 年版）》。

2 保健功能检验与评价方法仅作为推荐性方法，不作为强制性方法。针对已纳入功能目录的保健功能新的评价方法，参照保健功能目录的纳入程序，认可作为保健功能检验与评价的推荐性方法后，可供产品注册时使用。

目 录

第一部分 保健食品评价试验项目、试验原则及结果判定.....	1
一、有助于增强免疫力.....	1
二、有助于抗氧化.....	1
三、辅助改善记忆.....	2
四、缓解视觉疲劳.....	3
五、清咽润喉.....	3
六、有助于改善睡眠.....	4
七、缓解体力疲劳.....	4
八、耐缺氧.....	5
九、有助于控制体内脂肪.....	5
十、有助于改善骨密度.....	6
十一、改善缺铁性贫血.....	7
十二、有助于改善痤疮.....	7
十三、有助于改善黄褐斑.....	8
十四、有助于改善皮肤水份状况.....	8
十五、有助于调节肠道菌群.....	9
十六、有助于消化.....	10
十七、有助于润肠通便.....	11
十八、辅助保护胃粘膜.....	11
十九、有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平.....	12
二十、有助于维持血糖健康水平.....	14
二十一、有助于维持血压健康水平.....	15
二十二、对化学性肝损伤有辅助保护作用.....	15
二十三、对电离辐射危害有辅助保护作用.....	16
二十四、有助于排铅.....	17
第二部分 功能学检验方法.....	18
一、有助于增强免疫力检验方法.....	18
二、有助于抗氧化检验方法.....	31
三、辅助改善记忆检验方法.....	52
四、缓解视觉疲劳检验方法.....	63
五、清咽润喉检验方法.....	67
六、有助于改善睡眠检验方法.....	72
七、缓解体力疲劳检验方法.....	75
八、耐缺氧检验方法.....	81

九、有助于控制体内脂肪检验方法.....	84
十、有助于改善骨密度检验方法.....	88
十一、改善缺铁性贫血检验方法.....	96
十二、有助于改善痤疮检验方法.....	107
十三、有助于改善黄褐斑检验方法.....	109
十四、有助于改善皮肤水份状况检验方法.....	111
十五、有助于调节肠道菌群检验方法.....	113
十六、有助于消化检验方法.....	119
十七、有助于润肠通便检验方法.....	124
十八、辅助保护胃粘膜检验方法.....	128
十九、有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平检验方法.....	132
二十、有助于维持血糖健康水平检验方法.....	137
二十一、有助于维持血压健康水平检验方法.....	147
二十二、对化学性肝损伤有辅助保护作用检验方法.....	150
二十三、对电离辐射危害有辅助保护作用检验方法.....	157
二十四、有助于排铅检验方法.....	165

第一部分 保健食品评价试验项目、试验原则及结果判定

1 有助于增强免疫力

1.1 试验项目

1.1.1 体重

1.1.2 脏器/体重比值测定：胸腺/体重比值，脾脏/体重比值

1.1.3 细胞免疫功能测定：小鼠脾淋巴细胞转化实验，迟发型变态反应实验

1.1.4 体液免疫功能测定：抗体生成细胞检测，血清溶血素测定

1.1.5 单核—巨噬细胞功能测定：小鼠碳廓清实验，小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

1.1.6 NK 细胞活性测定

1.2 试验原则

1.2.1 所列指标均为必做项目。

1.2.2 采用正常或免疫功能低下的模型动物进行实验。

1.3 结果判定

有助于增强免疫力判定：在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核—巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方面任两个方面结果阳性，可判定该受试样品具有有助于增强免疫力作用。

其中细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一个实验的两个剂量组结果阳性，可判定细胞免疫功能测定结果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一个实验的两个剂量组结果阳性，可判定体液免疫功能测定结果阳性。单核—巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一个实验的两个剂量组结果阳性，可判定单核—巨噬细胞功能结果阳性。NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性，可判定 NK 细胞活性结果阳性。

2 有助于抗氧化

2.1 试验项目

2.1.1 动物实验

2.1.1.1 体重

2.1.1.2 脂质氧化产物：丙二醛或血清 8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）

2.1.1.3 蛋白质氧化产物：蛋白质羰基

2.1.1.4 抗氧化酶：超氧化物歧化酶或谷胱甘肽过氧化物酶

2.1.1.5 抗氧化物质：还原型谷胱甘肽

2.1.2 人体试食试验

2.1.2.1 脂质氧化产物：丙二醛或血清 8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）

2.1.2.2 超氧化物歧化酶

2.1.2.3 谷胱甘肽过氧化物酶

2.2 试验原则

2.2.1 动物实验和人体试食试验所列的指标均为必测项目。

2.2.2 脂质氧化产物指标中丙二醛和血清 8-表氢氧-异前列腺素任选其一进行指标测定，动物实验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。

2.2.3 氧化损伤模型动物和老龄动物任选其一进行生化指标测定。

2.2.4 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

2.3 结果判定

2.3.1 动物实验：脂质氧化产物、蛋白质氧化产物、抗氧化酶、抗氧化物质四项指标中三项阳性，可判定该受试样品有助于抗氧化动物实验结果阳性。

2.3.2 人体试食试验：脂质氧化产物、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶三项指标中二项阳性，且对机体健康无影响，可判定该受试样品具有有助于抗氧化的作用。

3 辅助改善记忆

3.1 试验项目

3.1.1 动物实验

3.1.1.1 体重

3.1.1.2 跳台实验

3.1.1.3 避暗实验

3.1.1.4 穿梭箱实验

3.1.1.5 水迷宫实验

3.1.2 人体试食试验

3.1.2.1 指向记忆

3.1.2.2 联想学习

3.1.2.3 图象自由回忆

3.1.2.4 无意义图形再认

3.1.2.5 人像特点联系回忆

3.1.2.6 记忆商

3.2 试验原则

3.2.1 动物实验和人体试食试验为必做项目。

3.2.2 跳台实验、避暗实验、穿梭箱实验、水迷宫实验四项动物实验中至少应选三项，以保证实验结果的可靠性。

3.2.3 正常动物与记忆障碍模型动物任选其一。

3.2.4 动物实验应重复一次（重新饲养动物，重复所做实验）。

3.2.5 人体试食试验统一使用临床记忆量表。

3.2.6 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

3.3 结果判定

3.3.1 动物实验：跳台实验、避暗实验、穿梭箱实验、水迷宫实验四项实验中任二项实验结果阳性。且重复实验结果一致（所重复的同一项实验两次结果均为阳性），可以判定该受试样品辅助改善记忆动物实验结果阳性。

3.3.2 人体试食试验：记忆商结果阳性，可判定该受试样品具有辅助改善记忆的作用。

4 缓解视觉疲劳

4.1 人体试食试验项目

4.1.1 分别于试食前后进行眼部症状及眼底检查，血、尿常规检查，肝、肾功能检查，症状询问、用眼情况调查；于试验前进行一次胸片、心电图、腹部 B 超检查。

4.1.2 明视持久度

4.1.3 视力

4.2 试验原则

4.2.1 受试样品试食时间为 30 天，必要时可延长至 60 天。

4.2.2 所列指标均为必做项目。

4.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

4.3 结果判定

4.3.1 试验组自身比较或试验组与对照组组间比较，症状改善有效率且症状总积分差异有显著性（ $P<0.05$ ）。

4.3.2 试验组自身比较或试验组与对照组组间比较，明视持久度差异有显著性（ $P<0.05$ ），且平均明视持久度提高大于等于 10%。

具备4.3.1及4.3.2可判定该受试物具有缓解视觉疲劳功能。

5 清咽润喉

5.1 试验项目

5.1.1 动物实验

5.1.1.1 体重

5.1.1.2 大鼠棉球植入实验

5.1.1.3 大鼠足趾肿胀实验

5.1.1.4 小鼠耳肿胀实验

5.1.2 人体试食试验：咽部症状、体征

5.2 试验原则

5.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

5.2.2 应对临床症状、体征进行观察。

5.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

5.3 结果判定

5.3.1 动物实验：大鼠棉球植入实验结果阳性，同时大鼠足趾肿胀实验或小鼠耳肿胀实验结果任意一项阳性，可判定该受试样品清咽润喉动物实验结果为阳性。

5.3.2 人体试食试验：试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，咽部症状及体征有明显改善，症状及体征的改善率明显增加，可判定该受试样品具有清咽润喉。

6 有助于改善睡眠

6.1 试验项目

6.1.1 体重

6.1.2 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验

6.1.3 戊巴比妥钠（或巴比妥钠）阈下剂量催眠实验

6.1.4 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

6.2 试验原则

6.2.1 所列指标均为必做项目。

6.2.2 需观察受试样品对动物直接睡眠的作用。

6.3 结果判定

延长戊巴比妥钠睡眠时间实验、戊巴比妥钠（或巴比妥钠）阈下剂量催眠实验、巴比妥钠睡眠潜伏期实验三项实验中任二项阳性，且无明显直接睡眠作用，可判定该受试样品具有有助于改善睡眠的作用。

7 缓解体力疲劳

7.1 实验项目

7.1.1 动物体重

7.1.2 负重游泳实验

7.1.3 血乳酸

7.1.4 血清尿素

7.1.5 肝糖原或肌糖原

7.2 试验原则

7.2.1 动物实验所列指标均为必做项目。

7.2.2 实验前必须对同批受试样品进行违禁成分的检测。

7.2.3 运动实验与生化指标检测相结合。

7.3 结果判定

负重游泳实验结果阳性，血乳酸、血清尿素、肝糖原/肌糖原三项生化指标中任二项指标阳性，可判定该

受试样品具有缓解体力疲劳的作用。

8 耐缺氧

8.1 试验项目

8.1.1 体重

8.1.2 常压耐缺氧实验

8.1.3 亚硝酸钠中毒存活实验

8.1.4 急性脑缺血性缺氧实验

8.2 试验原则

所列指标均为必做项目。

8.3 结果判定

常压耐缺氧实验、亚硝酸钠中毒存活实验、急性脑缺血性缺氧实验三项实验中任二项实验结果阳性，可判定该受试样品具有耐缺氧的作用。

9 有助于控制体内脂肪

9.1 试验项目

9.1.1 动物实验

9.1.1.1 体重、体重增重

9.1.1.2 摄食量、摄入总热量

9.1.1.3 体内脂肪含量（睾丸及肾周围脂肪垫）

9.1.1.4 脂/体比

9.1.2 人体试食试验

9.1.2.1 体重

9.1.2.2 腰围、臀围

9.1.2.3 体内脂肪含量

9.2 试验原则

9.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

9.2.2 动物实验中大鼠肥胖模型法和预防大鼠肥胖模型法任选其一。

9.2.3 控制体内多余脂肪，不单纯以减轻体重为目标。

9.2.4 引起腹泻或抑制食欲的受试样品不能作为有助于控制体内脂肪食品。

9.2.5 每日营养素摄入量应基本保证机体正常生命活动的需要。

9.2.6 对机体健康无明显损害。

9.2.7 实验前应对同批受试样品进行违禁成分的检测。

9.2.8 以各种营养素为主要成分替代主食的有助于控制体内脂肪食品可以不进行动物实验，仅进行人体试食

试验。

9.2.9 不替代主食的有助于控制体内脂肪试验，应对试食前后的受试者膳食和运动状况进行观察。

9.2.10 替代主食的有助于控制体内脂肪试验，除开展不替代主食的设计指标外，还应设立身体活动、情绪、工作能力等测量表格，排除服用受试样品后无相应的负面影响产生。结合替代主食的受试样品配方，对每日膳食进行营养学评估。

9.2.11 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

9.3 结果判定

9.3.1 动物实验：实验组的体重或体重增重低于模型对照组，体内脂肪含量或脂/体比低于模型对照组，差异有显著性，摄食量不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于控制体内脂肪动物实验结果阳性。

9.3.2 人体试食试验：

不替代主食的有助于控制体内脂肪受试样品：试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，体内脂肪含量减少，皮下脂肪四个点中任两个点减少，腰围与臀围之一减少，且差异有显著性，运动耐力不下降，对机体健康无明显损害，并排除膳食及运动对有助于控制体内脂肪作用的影响，可判定该受试样品具有有助于控制体内脂肪的作用。

替代主食的有助于控制体内脂肪受试样品：试食组试验前后自身比较，其体内脂肪含量减少，皮下脂肪四个点中至少有两个点减少，腰围与臀围之一减少，且差异有显著性（ $P<0.05$ ），微量元素、维生素营养学评价无异常，运动耐力不下降，情绪、工作能力不受影响，并排除运动对有助于控制体内脂肪作用的影响，可判定该受试样品具有有助于控制体内脂肪的作用。

10 有助于改善骨密度

10.1 试验项目

动物实验：分为方案一（补钙为主的受试物）和方案二（不含钙或不以补钙为主的受试物）两种。

10.1.1 体重

10.1.2 骨钙含量

10.1.3 骨密度

10.2 试验原则

10.2.1 根据受试样品作用原理的不同，方案一和方案二任选其一进行动物实验。

10.2.2 所列指标均为必做项目。

10.2.3 使用未批准用于食品的钙的化合物，除必做项目外，还必须进行钙吸收率的测定；使用属营养强化剂范围内的钙源及来自普通食品的钙源（如可食动物的骨、奶等），可以不进行钙的吸收率实验。

10.3 结果判定

方案一

骨钙含量或骨密度显著高于低钙对照组且不低于相应剂量的碳酸钙对照组，钙的吸收率不低于碳酸钙对照组，可判定该受试样品具有有助于改善骨密度的作用。

方案二

不含钙的产品，骨钙含量或骨密度较模型对照组明显增加，且差异有显著性，可判定该受试样品具有有助于改善骨密度的作用。

不以补钙为主（可少量含钙）的产品，骨钙含量或骨密度较模型对照组明显增加，差异有显著性，且不低于相应剂量的碳酸钙对照组，钙的吸收率不低于碳酸钙对照组，可判定该受试样品具有有助于改善骨密度的作用。

11 改善缺铁性贫血

11.1 试验项目

11.1.1 动物实验

11.1.1.1 体重

11.1.1.2 血红蛋白

11.1.1.3 红细胞压积/红细胞内游离原卟啉

11.1.2 人体试食试验

11.1.2.1 血红蛋白

11.1.2.2 血清铁蛋白

11.1.2.3 红细胞内游离原卟啉/血清运铁蛋白饱和度

11.2 试验原则

11.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

11.2.2 针对儿童的人体试食试验，只测血红蛋白和红细胞内游离原卟啉。

11.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

11.3 结果判定

11.3.1 动物实验：血红蛋白指标阳性，红细胞内游离原卟啉/红细胞压积二项指标一项指标阳性，可判定该受试样品改善缺铁性贫血动物实验结果为阳性。

11.3.2 人体试食试验

11.3.2.1 针对改善儿童缺铁性贫血功能的，血红蛋白和红细胞内游离原卟啉二项指标阳性，可判定该受试样品具有改善缺铁性贫血作用。

11.3.2.2 针对改善成人缺铁性贫血功能的，血红蛋白指标阳性，血清铁蛋白、红细胞内游离原卟啉/血清运铁蛋白饱和度二项指标一项指标阳性，可判定该受试样品具有改善缺铁性贫血作用。

12 有助于改善痤疮

12.1 人体试食试验项目

12.1.1 痤疮数量

12.1.2 皮损状况

12.1.3 皮肤油份

12.2 试验原则

12.2.1 所列的指标均为必做项目。

12.2.2 试验前后应针对固定皮肤范围内的痤疮数量及皮损状况进行分析。

12.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

12.3 结果判定

试食组痤疮数量明显减少且大于等于 20%，皮损程度积分明显减少，差异均有显著性，皮肤油份不显著增加，可判定该受试样品具有有助于改善痤疮的作用。

13 有助于改善黄褐斑

13.1 人体试食试验项目

13.1.1 黄褐斑面积

13.1.2 黄褐斑颜色

13.2 试验原则

13.2.1 所列的指标均为必做项目。

13.2.2 试验前后应针对固定皮肤范围内的黄褐斑面积及颜色进行分析。

13.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

13.3 结果判定

试食组黄褐斑面积明显减少且大于等于 10%，颜色积分明显下降，差异均有显著性，且不产生新的黄褐斑，可判定该受试样品具有有助于改善黄褐斑的作用。

14 有助于改善皮肤水份状况

14.1 人体试食试验项目：皮肤水份

14.2 试验原则

14.2.1 皮肤水份值的测定点试验前后应保持一致。

14.2.2 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

14.3 结果判定：试食组皮肤水份明显改善，差异有显著性，可判定该受试样品具有有助于改善皮肤水份状况的作用。

15 有助于调节肠道菌群

15.1 试验项目

15.1.1 动物实验

15.1.1.1 体重

15.1.1.2 双歧杆菌

15.1.1.3 乳杆菌

15.1.1.4 肠球菌

15.1.1.5 肠杆菌

15.1.1.6 产气荚膜梭菌

15.1.2 人体试食试验

15.1.2.1 双歧杆菌

15.1.2.2 乳杆菌

15.1.2.3 肠球菌

15.1.2.4 肠杆菌

15.1.2.5 拟杆菌

15.1.2.6 产气荚膜梭菌

15.2 试验原则

15.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

15.2.2 正常动物或肠道菌群紊乱模型动物任选其一。

15.2.3 受试样品中含双歧杆菌、乳杆菌以外的其它益生菌时，应在动物和人体试验中加测该益生菌。

15.2.4 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

15.3 结果判定

15.3.1 动物实验：符合以下任一项，可判定该受试样品有助于调节肠道菌群动物实验结果阳性。

15.3.1.1 双歧杆菌和/或乳杆菌（或其它益生菌）明显增加，梭菌减少或无明显变化，肠球菌、肠杆菌无明显变化。

15.3.1.2 双歧杆菌和/或乳杆菌（或其它益生菌）明显增加，梭菌减少或无明显变化，肠球菌和/或肠杆菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌、乳杆菌（或其它益生菌）增加的幅度。

15.3.2 人体试食试验：符合以下任一项，可判定该受试样品具有有助于调节肠道菌群的作用。

15.3.2.1 双歧杆菌和/或乳杆菌（或其它益生菌）明显增加，梭菌减少或无明显变化，肠球菌、肠杆菌、拟杆菌无明显变化。

15.3.2.2 双歧杆菌和/或乳杆菌（或其它益生菌）明显增加，梭菌减少或无明显变化，肠球菌和/或肠杆菌、拟杆菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌、乳杆菌（或其它益生菌）增加的幅度。

16 有助于消化

16.1 试验项目

16.1.1 动物实验

16.1.1.1 体重、体重增重、摄食量和食物利用率

16.1.1.2 小肠运动实验

16.1.1.3 消化酶测定

16.1.2 人体试食试验

16.1.2.1 儿童方案

16.1.2.1.1 食欲

16.1.2.1.2 食量

16.1.2.1.3 偏食状况

16.1.2.1.4 体重

16.1.2.1.5 血红蛋白含量

16.1.2.2 成人方案

16.1.2.2.1 临床症状观察

16.1.2.2.2 胃/肠运动实验

16.2 试验原则

16.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

16.2.2 根据受试样品的适用人群特点在人体试食试验方案中任选其一。

16.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

16.3 结果判定

16.3.1 动物实验：动物体重、体重增重、摄食量、食物利用率，小肠运动实验和消化酶测定三方面中任二方面实验结果阳性，可判定该受试样品有助于消化动物实验结果阳性。

16.3.2 人体试食试验

16.3.2.1 针对改善儿童消化功能的，食欲、进食量、偏食改善结果阳性，体重和血红蛋白二项指标中任一项指标结果阳性，可判定该受试样品具有有助于消化的作用。

16.3.2.2 针对改善成人消化功能的，临床症状明显改善，胃/肠运动实验结果阳性，可判定该受试样品具有有助于消化的作用。

17 有助于润肠通便

17.1 试验项目

17.1.1 动物实验

17.1.1.1 体重

17.1.1.2 小肠运动实验

17.1.1.3 排便时间

17.1.1.4 粪便重量

17.1.1.5 粪便粒数

17.1.1.6 粪便性状

17.1.2 人体试食试验

17.1.2.1 症状体征

17.1.2.2 粪便性状

17.1.2.3 排便次数

17.1.2.4 排便状况

17.2 试验原则

17.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

17.2.2 除对便秘模型动物各项必测指标进行观察外，还应对正常动物进行观察，不得引起动物明显腹泻。

17.2.3 排便次数的观察时间试验前后应保持一致。

17.2.4 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

17.3 结果判定

17.3.1 动物实验：排粪便重量和粪便粒数一项结果阳性，同时小肠运动实验和排便时间一项结果阳性，可判定该受试样品有助于润肠通便动物实验结果阳性。

17.3.2 人体试食试验：排便次数明显增加，同时粪便性状和排便状况一项结果明显改善，可判定该受试样品具有有助于润肠通便的作用。

18 辅助保护胃粘膜

18.1 试验项目

18.1.1 动物实验

18.1.1.1 体重

18.1.1.2 胃粘膜损伤大体观察

18.1.1.3 胃粘膜组织病理学检查

18.1.2 人体试食试验

18.1.2.1 临床症状

18.1.2.2 体征

18.1.2.3 胃镜观察

18.2 试验原则

18.2.1 动物实验的体重和胃粘膜损伤大体观察为必做项目，胃粘膜组织病理学检查为选做项目；人体试食试验所列指标均为必做项目。

18.2.2 无水乙醇、消炎痛致急性胃粘膜损伤模型或冰醋酸致慢性胃溃疡模型任选其一进行动物实验。

18.2.3 在进行人体试食试验时，应对受试样品的安全性作进一步的观察。

18.3 结果判定

18.3.1 动物实验：实验组与模型对照组比较，胃粘膜损伤明显改善，可判定该受试样品动物实验结果为阳性。

18.3.2 人体试食试验：试食组与对照组比较，临床症状、体征积分明显减少，胃镜复查结果有改善或不加重，可判定该受试样品具有辅助保护胃粘膜的作用。

19 有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平

根据血脂异常的类型，有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平按照不同的血脂异常分型设立分类的动物实验和人体试食试验。

19.1 试验项目

19.1.1 根据受试样品的作用机制，分成三种情况

19.1.1.1 有助于维持血脂健康水平功能：同时维持血总胆固醇和血甘油三酯健康水平

19.1.1.2 有助于维持血胆固醇健康水平功能：单纯维持血胆固醇健康水平

19.1.1.3 有助于维持血甘油三酯健康水平功能：单纯维持血甘油三酯健康水平

19.1.2 观察指标

19.1.2.1 体重

19.1.2.2 血清总胆固醇

19.1.2.3 血清甘油三酯

19.1.2.4 血清高密度脂蛋白胆固醇

19.1.2.5 血清低密度脂蛋白胆固醇

19.1.3 人体试食试验

19.1.3.1 血清总胆固醇

19.1.3.2 血清甘油三酯

19.1.3.3 血清高密度脂蛋白胆固醇

19.1.3.4 血清低密度脂蛋白胆固醇

19.2 试验原则

19.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必测项目。

19.2.2 根据受试样品的作用机制，可在动物实验的两个动物模型中任选一项。

19.2.3 根据受试样品的作用机制，可在人体试食试验的三个方案中任选一项。

19.2.4 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

19.3 结果判定

19.3.1 动物实验：

19.3.1.1 混合型高脂血症动物模型

有助于维持血脂健康水平（胆固醇/甘油三酯）功能结果判定：模型对照组和空白对照组比较，血清甘油三酯升高，血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇升高，差异均有显著性，判定模型成立。（1）各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇降低，且任一剂量组血清甘油三酯降低，差异均有显著性，同时各剂量组血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血脂健康水平功能动物实验结果阳性。（2）各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇降低，差异均有显著性，同时各剂量组血清甘油三酯不显著高于模型对照组，各剂量组血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血胆固醇健康水平功能动物实验结果阳性。（3）各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清甘油三酯降低，差异均有显著性，同时各剂量组血清总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇不显著高于模型对照组，血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血甘油三酯健康水平功能动物实验结果阳性。

19.3.1.2 高胆固醇血症动物模型

模型对照组和空白对照组比较，血清总胆固醇（TC）或低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）升高，差异有显著性，血清甘油三酯（TG）差异无显著性，判定模型成立。各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇降低，差异有显著性，并且各剂量组血清高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）不显著低于模型对照组，血清甘油三酯不显著高于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血胆固醇健康水平功能动物实验结果阳性。

19.3.2 人体试食试验

指标判定标准：

有效：TC 降低>10%或降至正常；TG 降低>15%或降至正常；HDL-C 上升>0.104mmol/L。

血脂总有效：TC、TG、HDL-C三项指标均达到有效标准者。

无效：未达到有效标准者。

19.3.2.1 有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平结果判定

试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，受试者血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇降低，差异均有显著性，同时血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于对照组，试验组血脂总有效率显著高于对照组，可判定该受试样品有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平人体试食试验结果阳性。

19.3.2.2 有助于维持血胆固醇健康水平功能结果判定

试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，受试者血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇降低，差异有显著性，同时血清甘油三酯不显著高于对照组，血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于对照组，试验组血清总胆固醇有效率显著高于对照组，可判定该受试样品有助于维持血胆固醇健康水平功能人体试食试验结果阳性。

19.3.2.3 有助于维持血甘油三酯健康水平功能结果判定

试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，受试者血清甘油三酯降低，差异有显著性，同时血清总胆

固醇和低密度脂蛋白胆固醇不显著高于对照组，血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于对照组，试验组血清甘油三酯有效率显著高于对照组，可判定该受试样品有助于维持血甘油三酯健康水平功能人体试食试验结果阳性。

20 有助于维持血糖健康水平

20.1 试验项目

20.1.1 动物实验

分为方案一（胰岛损伤高血糖模型）和方案二（胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型）两种

20.1.1.1 方案一（胰岛损伤高血糖模型）

20.1.1.1.1 体重

20.1.1.1.2 空腹血糖

20.1.1.1.3 糖耐量

20.1.1.2 方案二（胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型）

20.1.1.2.1 体重

20.1.1.2.2 空腹血糖

20.1.1.2.3 糖耐量

20.1.1.2.4 胰岛素

20.1.1.2.5 总胆固醇

20.1.1.2.6 甘油三酯

20.1.2 人体试食试验

20.1.2.1 空腹血糖

20.1.2.2 餐后 2 小时血糖

20.1.2.3 糖化血红蛋白（HbA1c）或糖化血清蛋白

20.1.2.4 总胆固醇

20.1.2.5 甘油三酯

20.2 试验原则

20.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

20.2.2 根据受试样品作用原理不同，方案一和方案二动物模型任选其一进行动物实验。

20.2.3 除对高血糖模型动物进行所列指标的检测外，应进行受试样品对正常动物空腹血糖影响的观察。

20.2.4 人体试食试验可在临床治疗的基础上进行。

20.2.5 应对临床症状和体征进行观察。

20.2.6 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

20.3 结果判定

20.3.1 动物实验：

方案一：空腹血糖和糖耐量二项指标中一项指标阳性，且对正常动物空腹血糖无影响，即可判定该受试

样品有助于维持血糖健康水平动物实验结果阳性。

方案二：空腹血糖和糖耐量二项指标中一项指标阳性，血脂（总胆固醇、甘油三酯）无明显升高，且对正常动物空腹血糖无影响，即可判定该受试样品有助于维持血糖健康水平动物实验结果阳性。

20.3.2 人体试食试验：空腹血糖、餐后 2 小时血糖、糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）、血脂四项指标均无显著升高，且空腹血糖、餐后 2 小时血糖两项指标中一项指标阳性，对机体健康无不利影响，可判定该受试样品具有有助于维持血糖健康水平的作用。

21 有助于维持血压健康水平

21.1 试验项目

21.1.1 动物实验

21.1.1.1 体重

21.1.1.2 血压

21.1.1.3 心率

21.1.2 人体试食试验

21.1.2.1 临床症状与体征

21.1.2.2 血压

21.1.2.3 心率

21.2 试验原则

21.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

21.2.2 动物实验应选择高血压模型动物和正常动物进行所列指标的观察。

21.2.3 人体试食试验可在临床治疗的基础上进行。

21.2.4 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

21.3 结果判定

21.3.1 动物实验：实验组动物血压明显低于对照组，且对实验组动物心率和正常动物血压及心率无影响，可判定该受试样品有助于维持血压健康水平动物实验结果阳性。

21.3.2 人体试食试验：舒张压或收缩压二项指标中任一指标结果阳性，可判定该受试样品具有有助于维持血压健康水平的作用。

22 对化学性肝损伤有辅助保护作用

22.1 试验项目

动物实验分为方案一（四氯化碳肝损伤模型）和方案二（酒精肝损伤模型）两种。

22.1.1 方案一（四氯化碳肝损伤模型）

22.1.1.1 体重

22.1.1.2 谷丙转氨酶（ALT）

22.1.1.3 谷草转氨酶（AST）

22.1.1.4 肝组织病理学检查

22.1.2 方案二（酒精肝损伤模型）

22.1.2.1 体重

22.1.2.2 丙二醛（MDA）

22.1.2.3 还原型谷胱甘肽（GSH）

22.1.2.4 甘油三酯（TG）

22.1.2.5 肝组织病理学检查

22.2 试验原则

22.2.1 所列指标均为必做项目。

22.2.2 根据受试样品作用原理的不同，方案一和方案二任选其一进行动物实验。

22.3 结果判定

方案一（四氯化碳肝损伤模型）：病理结果阳性，谷丙转氨酶和谷草转氨酶二指标中任一项指标阳性，可判定该受试样品具有对化学性肝损伤有辅助保护作用功能作用。

方案二（酒精肝损伤模型）：①肝脏 MDA、GSH、TG 三项指标结果阳性，可判定该受试样品对乙醇引起的肝损伤有辅助保护功能，②肝脏 MDA、GSH、TG 三指标中任二项指标阳性，且肝脏病理结果阳性，可判定该受试样品具有对乙醇引起的肝损伤有辅助保护作用功能的作用。

23 对电离辐射危害有辅助保护作用

23.1 实验项目

23.1.1 体重

23.1.2 外周血白细胞计数

23.1.3 骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数

23.1.4 小鼠骨髓细胞微核实验

23.1.5 血 / 组织中超氧化物歧化酶活性实验

23.1.6 血清溶血素含量实验

23.2 实验原则

外周血白细胞计数、骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数、小鼠骨髓细胞微核实验、血 / 组织中超氧化物歧化酶活性实验、血清溶血素含量实验中任选择三项进行实验。

23.3 结果判定

在外周血白细胞计数、骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数、小鼠骨髓细胞微核、血 / 组织中超氧化物歧化酶活性、血清溶血素含量五项实验中任何二项实验结果阳性，可判定该受试样品具有对电离辐射危害有辅助保护作用功能的作用。

24 有助于排铅

24.1 试验项目

24.1.1 动物实验

24.1.1.1 体重

24.1.1.2 血铅

24.1.1.3 骨铅

24.1.1.4 肝组织铅

24.1.2 人体试食试验

24.1.2.1 血铅

24.1.2.2 尿铅

24.1.2.3 尿钙

24.1.2.4 尿锌

24.2 试验原则

24.2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必做项目。

24.2.2 应对临床症状、体征进行观察。

24.2.3 对尿铅进行多次测定，以了解体内铅的排出情况。

24.2.4 在进行人体试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

24.3 结果判定

24.3.1 动物实验：实验组与模型对照组比较，骨铅含量显著降低，同时血铅或肝铅含量显著降低，可判定该受试样品动物实验结果为阳性。

24.3.2 人体试食试验：试食组与对照组组间比较，至少两个观察时点尿铅排出量增加且显著高于试验前，或总尿铅排出量明显增加。同时，对总尿钙、总尿锌的排出无明显影响，或总尿钙、总尿锌排出增加的幅度小于总尿铅排出增加的幅度，可判定该受试样品具有有助于排铅的作用。

第二部分 功能学检验方法

一、有助于增强免疫力检验方法

1. 实验动物

推荐用近交系小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

2. 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。

受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。免疫模型动物实验时间可适当延长。

3. 实验方法

3.1 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

可任选下列方法之一

3.1.1 MTT 法

3.1.1.1 原理

当 T 淋巴细胞受 ConA 刺激后发生母细胞发生增殖反应，活细胞特别是增殖细胞中的线粒体水解酶可将 MTT（一种淡黄色的唑氮盐）分解为兰紫色结晶，其光密度值能反映细胞的增殖情况。

3.1.1.2 仪器和材料

RPMI1640 细胞培养液、小牛血清、2-巯基乙醇（2-ME）、青霉素、链霉素、刀豆蛋白 A（ConA）、盐酸、异丙醇、MTT、Hank's 液、PBS 缓冲液（pH7.2-7.4）

纱布或 200 目筛网、24 孔培养板，96 孔培养板（平底），手术器械、二氧化碳培养箱、酶标仪、721 分光光度计、超净工作台、高压灭菌器、无菌滤器。

3.1.1.3 实验步骤

3.1.1.3.1 试剂配制

完全培养液 RPMI1640 培养液过滤除菌，用前加入 10%小牛血清，1%谷氨酰胺（200mmol/L），青霉素（100U/mL），链霉素（100μg/L）及 5×10^{-5} mol/L 的 2-巯基乙醇，用无菌的 1mol/L 的 HCl 或 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0—7.2，即完全培养液。

ConA 液 用双蒸水配制成 100μg/mL 的溶液，过滤除菌，在低温冰箱（-20℃）保存。

无菌 Hank's 液 用前以 3.5%的无菌 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2—7.4。

MTT 液 将 5mg MTT 溶于 1mL pH7.2 的 PBS 中，现配现用。

酸性异丙醇溶液 96mL 异丙醇中加入 4mL 1mol/L 的 HCl，临用前配制。

3.1.1.3.2 脾细胞悬液制备

无菌取脾，置于盛有适量无菌 Hank's 液平皿中，用镊子轻轻将脾磨碎，制成单个细胞悬液。经 200 目筛

网过滤，或用 4 层纱布将脾磨碎，用 Hank's 液洗 2 次，每次离心 10min (1000r/min)。然后将细胞悬浮于 1mL 的完全培养液中，用台酚兰染色计数活细胞数（应在 95%以上），调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。

3.1.1.3.3 淋巴细胞增殖反应

将每一份脾细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中，每孔 1mL，一孔加 75 μ L ConA 液（相当于 7.5 μ g/mL），另一孔作为对照，置 5%CO₂，37℃CO₂ 孵箱中培养 72h。培养结束前 4h，每孔轻轻吸去上清液 0.7mL，加入 0.7mL 不含小牛血清的 RPMI1640 培养液，同时加入 MTT (5mg/mL) 50 μ L/孔，继续培养 4h。培养结束后，每孔加入 1mL 酸性异丙醇，吹打混匀，使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中，每个孔作 3 个平行孔，用酶标仪，以 570nm 波长测定光密度值。也可将溶解液直接移入 2mL 比色杯中，721 分光光度计上在波长 570nm 测定 OD 值。

3.1.1.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 孔的光密度值代表淋巴细胞的增殖能力，受试样品组的光密度差值显著高于对照组的光密度差值，可判定该项实验结果阳性。

3.1.1.5 注意事项

本实验中 ConA 的浓度很重要，过低不能刺激足够的细胞增殖，过高会抑制细胞增殖，不同批号的 ConA 在实验前要进行预试，以找到最佳浓度。

3.1.2 同位素掺入法

3.1.2.1 原理

T 淋巴细胞在有丝分裂原 PHA、ConA 等的刺激下，产生增殖反应，DNA 和 RNA 合成明显增加，如在培养液中加入 ³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR)，则可被转化中的细胞摄入。测定标记淋巴细胞的放射强度可反映淋巴细胞增殖的程度。

3.1.2.2 仪器和材料

RPMI1640 细胞培养液、小牛血清、2-巯基乙醇 (2-ME)、青霉素、链霉素、刀豆蛋白 A (ConA)、Hank's 液、PBS 缓冲液 (pH7.2-7.4)、³H-TdR、闪烁液[2,5-二苯基恶唑 (PPO) 0.5g、1,4-双-(5-苯基恶唑基)-苯 (POPOP) 0.25g、二甲苯 500mL 混匀]

200 目筛网，96 孔培养板（平底），手术器械、二氧化碳培养箱、超净工作台、液体闪烁仪、多头细胞收集器、49 型玻璃纤维滤纸。

3.1.2.3 实验步骤

3.1.2.3.1 脾细胞悬液制备

无菌取脾，置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中，用镊子轻轻将脾撕碎，制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤，用 Hank's 液洗 3 次，每次离心 10min (1000r/min)。然后将细胞悬浮于 2mL 的完全培养液中，用台酚兰染色计数活细胞数（应在 95%以上），最后用 RPMI1640 完全培养液将细胞数调成 5×10^6 个/mL。

3.1.2.3.2 淋巴细胞增殖反应

将脾细胞悬液加入到 96 孔培养板中, 200 μ L/孔, 每一份脾细胞悬液分装 6 个孔, 3 孔加 ConA (5 μ g/mL), 另 3 个孔不加 ConA 作为对照。置 5% CO₂, 37℃培养 72h, 培养结束前 6h, 每孔加入 ³H-TdR 20 μ L, 使其终浓度为 (3.7—18.5) $\times 10^4$ Bq/mL。用多头细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤纸上。滤纸片充分干燥后置测量瓶中, 加入 7mL 闪烁液, 用液闪仪测定每分钟脉冲数 (cpm)。

3.1.2.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

以每分钟脉冲数 (cpm) 表示增殖程度, 用刺激指数 (SI) 来表示

$$SI = \frac{\text{实验孔cpm}}{\text{对照孔cpm}}$$

受试样品组的 SI 值显著高于对照组的 SI 值, 即可判定该项实验结果阳性。

3.2 迟发型变态反应 (DTH)

可任选下列方法之一

3.2.1 二硝基氟苯诱导小鼠 DTH (耳肿胀法)

3.2.1.1 原理

二硝基氟苯 (DNFB) 稀释液可与腹壁皮肤蛋白结合成完全抗原, 由此刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞。4~7 天后再将其涂抹于耳部进行抗原攻击, 使局部肿胀, 一般在抗原攻击后 24~48h 达高峰, 其肿胀程度可以反应迟发型变态反应程度。

3.2.1.2 材料

DNFB、丙酮、麻油、硫化钡、打孔器。

3.2.1.3 实验步骤

3.2.1.3.1 试剂配制

DNFB 溶液 DNFB 溶液应新鲜配制, 称取 DNFB 50mg, 置清洁干燥小瓶中, 将预先配好的 5mL 丙酮麻油溶液 (丙酮: 麻油=1: 1), 倒入小瓶, 盖好瓶塞并用胶布密封。混匀后, 用 250 μ L 注射器通过瓶盖取用。

3.2.1.3.2 致敏 每鼠腹部皮肤用硫化钡脱毛或剃毛, 范围约 3cm $\times$ 3cm, 用 DNFB 溶液 50 μ L 均匀涂抹致敏。

3.2.1.3.3 DTH 的产生与测定 5 天后, 用 DNFB 溶液 10 μ L 均匀涂抹于小鼠右耳 (两面) 进行攻击。攻击后 24h 颈椎脱臼处死小鼠, 剪下左右耳壳。用打孔器取下直径 8mm 的耳片, 称重。

3.2.1.4 数据处理与结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

用左右耳重量之差表示 DTH 的程度。受试样品组的重量差值显著高于与对照组的重量差值, 可判定该项实验结果阳性。

3.2.1.5 注意事项

操作时应避免 DNFB 与皮肤接触。

3.2.2 绵羊红细胞 (SRBC) 诱导小鼠 DTH (足跖增厚法)

3.2.2.1 原理

SRBC 可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞, 4 天后, 当再以 SRBC 攻击时, 攻击部位出现肿胀, 其肿胀程度可反映迟发型变态反应程度。

3.2.2.2 材料

游标卡尺 (精密度 0.02mm)、SRBC、微量注射器 (50 μ L)。

3.2.2.3 实验步骤

3.2.2.3.1 致敏 小鼠用 2% (v/v) SRBC 腹腔或静脉注射免疫, 每只鼠注射 0.2mL (约 1×10^8 个 SRBC)。

3.2.2.3.2 DTH 的产生与测定 免疫后 4 天, 测量左后足跖部厚度, 然后在测量部位皮下注射 20% (v/v) SRBC, 每只鼠 20 μ L (约 1×10^8 个 SRBC), 注射后于 24h 测量左后足跖部厚度, 同一部位测量三次, 取平均值。

3.2.2.4 数据处理和结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

以攻击前后足跖厚度的差值来表示 DTH 的程度。受试样品组的差值显著高于对照组的差值, 可判定该项实验结果阳性。

3.2.2.5 注意事项

测量足跖厚度时, 最好由专人来进行。卡尺紧贴足跖部, 但不要加压, 否则会影响测量结果。

攻击时所用的 SRBC 要新鲜 (4 $^{\circ}$ C 保存期不超过 1 周)。

3.3 抗体生成细胞检测 (Jerne 改良玻片法)

3.3.1 原理

经过绵羊红细胞 (SRBC) 免疫的小鼠脾细胞悬液与一定量的 SRBC 混合, 在补体参与下, 使分泌抗体的脾细胞周围的 SRBC 溶解, 形成肉眼可见的空斑。溶血空斑数可反映抗体生成细胞数。

3.3.2 仪器和材料

二氧化碳培养箱、恒温水浴、离心机、手术器械、玻片架、200 目筛网、SRBC、补体 (豚鼠血清)、Hank's 液、RPMI1640 培养液、SA 缓冲液、琼脂糖。

3.3.3 实验步骤

3.3.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血, 将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中, 朝一个方向摇动, 以脱纤维, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用, 可保存 2 周。

3.3.3.2 制备补体 采集豚鼠血, 分离出血清 (至少 5 只豚鼠的混合血清), 将 1mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中, 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 30min, 经常振荡, 离心取上清, 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存。用时以 SA 缓冲液按 1: 8—15 稀释。

3.3.3.3 玻片涂膜 在清洁玻片上刷上一薄层琼脂糖 (0.5g 琼脂糖加双蒸水至 100mL, 加热溶解), 干后可长

期保存备用。

3.3.3.4 免疫动物 取脱纤维的羊血，用生理盐水洗涤3次，每次离心（2000r/min）10min，计数细胞，每只鼠经腹腔或静脉注射 SRBC $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 个。也可将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%（v/v）的细胞悬液，每只鼠腹腔注射 0.2mL。

3.3.3.5 脾细胞悬液制备

将 SRBC 免疫 4~5 天后的小鼠颈椎脱臼处死，取出脾脏，放在盛有 Hank's 液的小平皿内，轻轻磨碎脾脏，制成细胞悬液，经 200 目筛网过滤，或用 4 层纱布将脾磨碎，离心（1000r/min）10min，用 Hank's 液洗 2 遍，最后将细胞悬浮在 5mL RPMI1640 培养液中，计数细胞，并将细胞浓度调整为 5×10^6 个/mL。也可将细胞悬浮在 8mL Hank's 液。

3.3.3.6 空斑的测定

将表层培养基（1g 琼脂糖加双蒸水至 100mL）加热溶解后，放 45~50℃水浴保温，与等量 pH7.2~7.4、2 倍浓度的 Hank's 液混合，分装小试管，每管 0.5mL，再向管内加 50μL 10% SRBC（v/v，用 SA 缓冲液配制），20μL 脾细胞悬液（ 5×10^6 个/mL）或 25μL 脾细胞悬液，迅速混匀，倾倒入已刷琼脂糖薄层的玻片上，做平行片，待琼脂凝固后，将玻片水平扣放在片架上，放入二氧化碳培养箱中孵育 1~1.5h，然后用 SA 缓冲液稀释的补体（1:8）加入到玻片架凹槽内，继续温育 1~1.5h 后，计数溶血空斑数。

3.3.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

用空斑数/ 10^5 脾细胞或空斑数/全脾细胞来表示，受试样品组的空斑数显著高于对照组的空斑数，可判定该项实验结果阳性。

3.4 血清溶血素的测定

可任选下列方法之一。

3.4.1 血凝法

3.4.1.1 原理

用 SRBC 免疫动物后，产生抗 SRBC 抗体（溶血素），利用其凝集 SRBC 的程度来检测溶血素的水平。

3.4.1.2 仪器和材料

SRBC、生理盐水、微量血凝实验板、离心机

3.4.1.3 实验步骤

3.4.1.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血，将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中，朝一个方向摇动，以脱纤维，放入 4℃冰箱保存备用，可保存 2 周。

3.4.1.3.2 免疫动物及血清分离 取羊血，用生理盐水洗涤 3 次，每次离心（2000r/min）10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%（v/v）的细胞悬液，每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4~5 天后，摘除眼球取血于离心管内，放置约 1h，将凝固血与管壁剥离，使血清充分析出，2000r/min 离心 10min，收集血清。

3.4.1.3.3 凝集反应 用生理盐水将血清倍比稀释，将不同稀释度的血清分别置于微量血凝实验板内，每孔

100 μ L, 再加入 100 μ L 0.5% (v/v) 的 SRBC 悬液, 混匀, 装入湿润的平盘内加盖, 于 37℃ 温箱孵育 3h, 观察血球凝集程度。

3.4.1.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

血清凝集程度一般分为 5 级 (0—IV) 记录, 按下式计算抗体积数, 受试样品组的抗体积数显著高于对照组的抗体水平, 可判定该项实验结果阳性。

$$\text{抗体水平} = (S_1 + 2S_2 + 3S_3 + \dots + nS_n)$$

式中 1、2、3…… n 代表对倍稀释的指数, S 代表凝集程度的级别, 抗体积数越大, 表示血清抗体越高。

0 级 红细胞全部下沉, 集中在孔底部形成致密的圆点状, 四周液体清晰。

I 级 红细胞大部分沉集在孔底成园点状, 四周有少量凝集的红细胞。

II 级 凝集的红细胞在孔底形成薄层, 中心可以明显见到一个疏松的红点。

III 级 凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层, 中心隐约可见一个小红点。

IV 级 凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层, 凝块有时成卷折状。

3.4.1.5 注意事项

血清稀释时要充分混匀。最后一个稀释度应不出现凝集现象。

3.4.2 半数溶血值 (HC₅₀) 的测定

3.4.2.1 原理

用 SRBC 免疫动物后, 血清中出现 SRBC 抗体 (溶血素), 在补体参与下, 与 SRBC 一起孵育, 可发生溶血反应, 释放血红蛋白, 通过测定血红蛋白含量反映动物血清中溶血素的含量。

3.4.2.2 仪器和材料

721 分光光度计、离心机、恒温水浴、SRBC、补体 (豚鼠血清)、SA 缓冲液、都氏试剂 (碳酸氢钠 1.0g、高铁氰化钾 0.2g、氰化钾 0.05g, 加蒸馏水至 1000mL)

3.4.2.3 实验步骤

3.4.2.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血, 将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中朝一个方向摇动, 以脱纤维, 放入 4℃ 冰箱保存备用, 可保存 2 周。

3.4.2.3.2 制备补体 采集豚鼠血, 分离出血清 (至少 5 只豚鼠的混合血清), 将 1mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中, 放 4℃ 冰箱 30min, 经常振荡, 离心取上清, 分装, -70℃ 保存。用时以 SA 液按 1: 8 稀释。

3.4.2.3.3 免疫动物及血清分离 取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次离心 (2000r/min) 10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2% (v/v) 的细胞悬液, 每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4~5 天后, 摘除眼球取血于离心管内, 放置约 1h, 使血清充分析出, 2000r/min 离心 10min, 或 6000r/min, 4min, 收集血清。

3.4.2.3.4 溶血反应

3.4.2.3.4.1 分光光度计法 取血清用 SA 缓冲液稀释 (一般为 200~500 倍)。将稀释后的血清 1mL 置试管内, 依次加入 10% (v/v) SRBC 0.5mL, 补体 1mL (用 SA 液按 1:8 稀释)。另设不加血清的对照管 (以 SA 缓冲

液代替)。置 37℃ 恒温水浴中保温 15~30min 后,冰浴终止反应。2000r/min 离心 10min。取上清液 1mL,加都氏试剂 3mL,同时取 10% (v/v) SRBC 0.25mL 加都氏试剂至 4mL,充分混匀,放置 10min 后,于 540nm 处以对照管作空白,分别测定各管光密度值。

3.4.2.3.4.2 酶标仪法 设样品孔和空白对照孔,样品孔:取血清用 SA 缓冲液稀释(一般 200~500 倍);每孔加入稀释后的血清 50μL;空白对照孔:每孔加入 50μL SA 缓冲液,再依次加入 10% (v/v) SRBC 25μL,补体 50μL(用 SA 溶液按 1:8 稀释),置 37℃ 恒温培养箱中保温 30min,冰浴终止反应,1500r/min 水平离心 10min,然后样品孔和空白对照孔各取上清液 50μL 加入另一个 96 孔培养板内,加都氏试剂 150μL。同时设半数溶血孔,加入 10% (v/v) SRBC 12.5μL 再加都氏试剂至 200μL。用震荡器充分混匀,放置 10min 后,于 540nm 处用全自动酶标仪测定各孔光密度值。

3.4.2.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析,但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验,方差齐,计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$,结论:各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$,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;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。

溶血素的量以半数溶血值 (HC_{50}) 表示,按下列公式计算,受试样品组的 HC_{50} 显著高于对照组的 HC_{50} ,可判定该项实验结果阳性。

$$HC_{50} = \frac{\text{样品光密度值}}{SRBC \text{ 半数溶血时的光密度值}} \times \text{稀释倍数}$$

3.5 小鼠碳廓清实验

3.5.1 原理

在一定范围内,体内碳颗粒被清除速率与血碳浓度呈指数函数关系。

以血碳浓度对数值为纵坐标,时间为横坐标,两者呈直线关系。此直线斜率 (K) 可表示吞噬速率。动物肝、脾重量影响吞噬速率,一般以校正吞噬指数 a 表示。

3.5.2 仪器和试剂

721 分光光度计、计时器、血色素吸管、印度墨汁、 Na_2CO_3

3.5.3 实验步骤

3.5.3.1 溶液配制

注射用墨汁 将印度墨汁原液用生理盐水稀释 3~4 倍。

Na_2CO_3 溶液 取 0.1g Na_2CO_3 ,加蒸馏水至 100mL。

3.5.3.2 注射墨汁 按体重从小鼠尾静脉注入稀释的印度墨汁 (10ml/kg),待墨汁注入,立即计时。

3.5.3.3 测定

注入墨汁后 2、10min,分别从内眦静脉丛取血 20μL,并立即将其加到 2mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中。用 721 分光光度计在 600nm 波长处测光密度值 (OD),以 Na_2CO_3 溶液作空白对照,也可用酶标仪在 600nm 波长处测光密度值 (OD)。

将小鼠处死,取肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,分别称重。

以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力。按下式计算吞噬指数 a 。受试样品组的吞噬指数显著高于对照组的

吞噬指数，可判定该项实验结果阳性。

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1}$$

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{k}$$

3.5.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

3.5.5 注意事项

静脉注入碳粒的量、取血时间、取血量一定要准确。

墨汁放置中，碳粒可沉于瓶底，临用前应摇匀。

使用新的墨汁时，应在实验前摸索一个最适墨汁注入量，即正常小鼠在 20min 内不易廓清。

3.6 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

可任选下列方法之一。

3.6.1 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验（滴片法）

3.6.1.1 原理

利用巨噬细胞对光滑表面如玻璃表面具有粘附的特性，将含有巨噬细胞的腹腔液滴于载玻片上，加入鸡红细胞，孵育一定时间后，冲洗掉未粘附的细胞，固定染色，在显微镜下计数吞噬鸡红细胞的巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数，据此判定巨噬细胞的吞噬能力。

3.6.1.2 仪器和材料：

显微镜、37℃孵箱、计数器、手术器械一套、注射器、滴管、胶头吸管、吸耳球、载玻片、染色槽、试管

3.6.1.2.1 玻片处理

重复使用的载玻片要经洗液浸泡、洗净晾干后，经酒精浸泡过夜。用前以纱布拭干或晾干，否则会影响巨噬细胞粘附和镜检。在玻片上标号，用 3%琼脂（配方见试剂部分）每个玻片上划两个圆圈（圆圈必须全封闭，否则液体会流出），晾干备用。

3.6.1.2.2 搪瓷或塑料盒：内垫半湿纱布（用温水湿透，置于孵箱内备用），纱布一定要平整。

3.6.1.2.3 试剂配制方法

3.6.1.2.3.1 3%琼脂的配制：

取琼脂 3g，加水 100mL，加热煮沸至透明，加入 1%的溴甲酚紫指示剂 1—2 滴。

3.6.1.2.3.2 PBS 缓冲液的配制方法：

KH_2PO_4 6.66g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.38g, 将上述试剂溶于 1000mL 蒸馏水中调 pH 值至 7.2 即成。

3.6.1.2.3.3 1%鸡红细胞悬液:

实验前取鸡颈静脉或动脉血, 置于盛有玻璃珠(20 个左右)的三角瓶内, 连续顺一个方向充分摇动 5~10min, 除去纤维蛋白, 4℃冰箱保存。实验前用生理盐水洗涤 3 次, 1500r/min, 离心 10min, 弃去上清, 按血球压积用 Hank's 液配制成 1%的红细胞悬液。

3.6.1.2.3.4 Giemsa 染液:

a.取 Giemsa 染料 0.5g, 中性甘油 33mL, 甲醇 33mL。先将 Giemsa 染料置清洁研钵中, 加甘油后, 研磨片刻, 倒入棕色瓶内, 放置 55~60℃水浴箱内 2 小时, 不断摇匀, 再加入甲醇摇匀, 保存备用。

b.稀释姬姆萨氏染色液: 使用时, 用 pH6.8 的缓冲液 8 份, 加姬姆萨氏染色液原液 1 份, 即成应用液。

3.6.1.2.3.5 Giemsa 染液脱色液: 配制方法: 甲醇 20mL, 蒸馏水 80mL。混合后加 2N HCl₂ 滴即成。

3.6.1.3 实验步骤

小鼠巨噬细胞的激活:实验前 4 天给每只小鼠腹腔注射 2%压积羊红细胞 0.2mL。用颈椎脱臼法处死小鼠, 腹腔注射加小牛血清的 Hank's 液 4mL/只, 轻轻按揉腹部 20 次, 以充分洗出腹腔巨噬细胞, 然后将腹壁剪开一个小口, 用胶头吸管吸取腹腔洗液 2mL 于试管内(或用注射器)。用 1mL 加样器吸取腹腔洗液 0.5mL 加入盛有 0.5mL 1%鸡红细胞悬液的试管内, 混匀。用注射器(装大针头)吸取 0.5mL 混合液, 加入玻片的琼脂圈内。放置孵箱内 37℃孵育 15—20 分钟。孵育结束后迅速用生理盐水将未贴壁细胞冲掉, 于甲醇液中固定 1 分钟, Giemsa 液染色 15 分钟。用蒸馏水冲洗干净, 晾干, 用 40×显微镜计数吞噬率和吞噬指数。吞噬率为每 100 个巨噬细胞中, 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞所占的百分率; 吞噬指数为平均每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的个数。

3.6.1.4 数据处理及结果判定

见 3.6.2.4.

3.6.1.5 注意事项

颈椎脱臼处死小鼠勿用力过大, 防止腹腔内血管和内脏破裂出血影响实验结果。

放滴片的搪瓷盘内应保持一定的湿度, 以防液体干燥。

孵育后的标本冲洗次数的差别不宜太大, 更不要直接冲在有细胞的部分。

实验操作过程中应严格掌握时间。

在镜下计数细胞时要数完一个视野后再换另一个视野。

3.6.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

3.6.2.1 原理

在体内腹腔巨噬细胞能吞噬鸡红细胞。据此判断巨噬细胞的吞噬功能。

3.6.2.2 仪器和材料

显微镜、鸡红细胞、丙酮、甲醇、生理盐水、Giemsa 染液。

3.6.2.3 实验步骤

3.6.2.3.1 鸡红细胞悬液制备 取鸡血置于有玻璃珠的锥形瓶中, 朝一个方向充分摇动, 以脱纤维。用生理盐水洗涤 2~3 次, 离心(2000r/min, 10min), 去上清, 用生理盐水配成 20% (v/v) 的鸡红细胞悬液。

3.6.2.3.2 吞噬功能测定 每鼠腹腔注射 20% 鸡红细胞悬液 1mL。间隔 30min—1.5h, 颈椎脱臼处死动物, 将

其仰位固定于鼠板上，正中剪开腹壁皮肤，经腹腔注入生理盐水 2mL，转动鼠板 1min。然后吸出腹腔洗液 1mL，平均分滴于 2 片载玻片上，放入垫有湿纱布的搪瓷盒内，移置 37℃ 孵箱温育 30min。孵毕，于生理盐水中漂洗，以除去未贴片细胞。晾干，以 1:1 丙酮甲醇溶液固定，4% (v/v) Giemsa-磷酸缓冲液染色 3min，再用蒸馏水漂洗晾干。

油镜下计数巨噬细胞，每张片计数 100 个，按下式计算吞噬百分率和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率 (\%)} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}}$$

在计数时，应同时观察鸡红细胞被消化的程度。借以判定巨噬细胞吞噬与消化功能，通常分为 4 级：

I 级：未消化。被吞噬的鸡红细胞完整，胞质浅红或浅黄带绿色，胞核浅紫色。

II 级：轻度消化。胞质浅黄绿色、胞核固缩呈紫蓝色。

III 级：重度消化。胞质淡染，胞核淡浅灰色。

IV 级：完全消化。巨噬细胞内仅见形态类似鸡红细胞大小的空泡，边缘整齐，胞核隐约可见。

3.6.2.4 数据处理及结果判定

以吞噬百分率或吞噬指数表示小鼠巨噬细胞的吞噬能力。吞噬百分率需进行数据转换， $X = \text{Sin}^{-1} \sqrt{p}$ ，式中 P 为吞噬百分率，用小数表示。在进行方差分析时，需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组的吞噬百分率或吞噬指数与对照组比较，差异均有显著性，方可判定该项实验结果阳性。

3.7 NK 细胞活性测定

可任选下列方法之一

3.7.1 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定法

3.7.1.1 原理

正常情况下，活细胞胞浆内的含有 LDH 不能透过细胞膜，当细胞受到 NK 细胞的杀伤后，LDH 释放到细胞外。LDH 可使乳酸锂脱氢，进而使 NAD 还原成 NADH，后者再经递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 还原碘硝基氯化四氮唑蓝 (INT)，INT 接受 H^+ 被还原成紫红色甲臢类化合物。在酶标仪上用 490nm 比色测定。

3.7.1.2 仪器和材料

酶标仪、YAC-1 细胞、Hank's 液 (pH7.2~7.4)、RPMI1640 完全培养液、乳酸锂或乳酸钠、碘硝基氯化

四氮唑蓝(INT)、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)、NAD、0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)、1%NP40 或 2.5%Triton

3.7.1.3 实验步骤

3.7.1.3.1 LDH 基质液的配制

乳酸锂 5×10^{-2} mol/L

碘硝基氯化四氮唑蓝 (INT) 6.6×10^{-4} mol/L

吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 2.8×10^{-4} mol/L

氧化型辅酶 I (NAD) 1.3×10^{-3} mol/L

将上述试剂溶于 0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中 (pH8.2)

3.7.1.3.2 靶细胞的传代 (YAC-1 细胞)

实验前 24h 将靶细胞进行传代培养。用前以 Hank's 液洗 3 次, 用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。

3.7.1.3.3 脾细胞悬液的制备 (效应细胞)

无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中, 用镊子轻轻将脾磨碎, 制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤, 或用 4 层纱布将脾磨碎, 或用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10min (1000r/min)。弃上清将细胞浆弹起, 加入 0.5mL 灭菌水 20 秒, 裂解红细胞后再加入 0.5mL 2 倍 Hank's 液及 8mL Hank's 液, 1000r/min, 10min 离心; 或采用 NH_4Cl -Tris 红细胞裂解液裂解红细胞, 离心 10min (1000r/min), 弃红色上清。用 1mL 含 10%小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬, 用 1%冰醋酸稀释后计数, 用台酚兰染色计数活细胞数 (应在 95%以上), 最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL。

3.7.1.3.4 NK 细胞活性检测

取靶细胞和效应细胞各 100 μ L (效靶比 50:1), 加入 U 型 96 孔培养板中; 靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100 μ L, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1%NP40 或 2.5%Triton 各 100 μ L; 上述各项均设三个平行孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4h, 然后将 96 孔培养板以 1500r/min 离心 5min, 每孔吸取上清 100 μ L 置平底 96 孔培养板中, 同时加入 LDH 基质液 100 μ L, 根据室温不同反应 3~10min, 每孔加入 1mol/L 的 HCl 30 μ L, 在酶标仪 490nm 处测定光密度值 (OD)。

按下式计算 NK 细胞活性, 受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性, 即可判定该项实验结果阳性。

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{\text{反应孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}}{\text{最大释放孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}} \times 100\%$$

3.7.1.4 数据处理及结果判定

NK 细胞活性需进行数据转换, $X = \sin^{-1} \sqrt{p}$, 式中 P 为 NK 细胞活性, 用小数表示, 然后再进行方差分析, 需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, $F \text{ 值} < F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; $F \text{ 值} \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性, 可判定该项实验结果阳性。

3.7.1.5 注意事项

靶细胞和效应细胞必须新鲜，细胞存活率应大于 95%。

反应时环境温度应保持恒定。

LDH 基质液应临用前配制。

在一定范围内，NK 细胞活性与效靶比值成正比。一般效靶比值不应超过 100。

3.7.2 同位素 ^3H -TdR 测定法

1.3.7.2.1 原理

将用同位素 ^3H -TdR 标记的靶细胞与淋巴细胞共同培养时，靶细胞可被 NK 细胞杀伤。同位素便从被杀伤的靶细胞中释放出来，其释放的量与 NK 细胞活性成正比。通过测定靶细胞 ^3H -TdR 的释放率即可反应 NK 细胞的活性。

3.7.2.2 仪器和材料

液体闪烁仪、多头细胞收集器、二氧化碳培养箱、 ^3H -TdR、RPMI1640 完全培养液、Hank's 液 (pH7.2~7.4)、YAC-1 细胞、Triton X-100

3.7.2.3. 实验步骤

3.7.2.3.1 靶细胞的标记

取传代后 24h 生长良好的 YAC-1 细胞 (存活率>95%) 按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ YAC-1 细胞悬液加 ^3H -TdR 10uCi 进行标记，于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 2h，每 30min 振荡 1 次。标记后的细胞用培养液洗涤 3 次，重悬于培养液中，使细胞浓度为 1×10^5 个/mL。

3.7.2.3.2 脾细胞悬液的制备 (效应细胞)

无菌取脾，置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中，用镊子轻轻将脾撕碎，制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤，用 Hank's 液洗 3 次，每次离心 10min (1000r/min)。然后将细胞悬浮于 2mL 的完全培养液中，用台酚兰染色计数活细胞数 (应在 95%以上)，最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。

3.7.2.3.3 NK 细胞活性测定

在 96 孔培养板中每孔加 100 μL 标记的靶细胞，实验孔加 100 μL 效应细胞，空白对照孔加 100 μL 培养液，最大释放孔加 100 μL 2.5% Triton X-100。每个样品设 3 个复孔，置 5% CO_2 、 37°C 培养箱内温育 4h，用多头细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上，用液体闪烁仪进行测量。

按下式计算 NK 细胞活性：

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验孔 cpm}}{\text{空白对照孔 cpm} - \text{最大释放孔 cpm}}\right) \times 100\%$$

3.7.2.4 数据处理及结果判定

NK 细胞活性需进行数据转换， $X = \sin^{-1} \sqrt{p}$ ，式中 P 为 NK 细胞活性，用小数表示。在进行方差分析时，需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值，F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性；F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性，可判定该项实验结果阳性。

4. 有助于增强免疫力结果判定

有助于增强免疫力判定：在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核—巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方面任两个方面结果阳性，可判定该受试样品具有有助于增强免疫力作用。

其中细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定细胞免疫功能测定结果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定体液免疫功能测定结果阳性。单核—巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定单核—巨噬细胞功能结果阳性。NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性，可判定 NK 细胞活性结果阳性。

二、有助于抗氧化检验方法

1 动物实验

1.1 实验动物

选用 10 月龄以上老龄大鼠或 8 月龄以上老龄小鼠，也可用氧化损伤模型鼠。单一性别，小鼠每组 10—15 只，大鼠 8—12 只。

1.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个溶剂对照组，以人体推荐量的 10 倍（小鼠）或 5 倍（大鼠）为其中的一个剂量组，另设两个剂量组，高剂量一般不超过 30 倍，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。

1.3 实验方法

1.3.1 老龄动物

选用 10 月龄以上大鼠或 8 月龄以上小鼠，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。

1.3.2 D-半乳糖氧化损伤模型

1.3.2.1 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，引起过氧化效应。

1.3.2.2 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。

1.3.3 乙醇氧化损伤模型

1.3.3.1 原理

乙醇大量摄入，激活氧分子产生自由基，导致组织细胞过氧化效应及体内还原型谷胱甘肽的耗竭。

1.3.3.2 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。

1.3.4 脂质氧化产物测定

1.3.4.1 血中过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 含量测定

血中过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 含量可采用荧光法和比色法测定, 方法任选其一。

1.3.4.1.1 荧光法

1.3.4.1.1.1 荧光法原理

MDA (malondialdehyde) 是细胞膜脂质过氧化的终产物之一, 测其含量可间接估计脂质过氧化的程度。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。以波长 536nm 为激发光, 在 550nm 有最强荧光强度。可用荧光法进行微量测定。

1.3.4.1.1.2 仪器与试剂

仪器: 荧光分光光度计、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管

试剂:

10mmol/L 四乙氧基丙烷 (贮备液, 棕色瓶 4℃ 保存 12 个月), 临用前用纯水稀释成 1nmol/mL

29mmol/L 硫代巴比妥酸工作液

硫代巴比妥酸 0.209g

EDTA·2H₂O 25mg

谷胱甘肽 (还原型) 1mg

用 0.02mol/L NaOH 50mL 溶解 (微温助溶, 棕色瓶 4℃ 保存 2 周)

酸水解液

0.1mol/L H₂SO₄ 125mL

0.1mol/L Na₂SO₄ 125mL

加水 150mL 用 H₂SO₄ 调 pH 1.5, 加水稀释至 500mL

正丁醇

以上所用玻璃器皿均需经 50%硝酸浸泡 24h 后, 再经蒸馏水、双蒸水淋洗干燥, 试剂 (选 AR 级) 最好用双蒸水配制。

1.3.4.1.1.3 实验步骤

1.3.4.1.1.3.1 样品制备

全血上清液: 取血 50μL 加入 0.5mL 生理盐水, 2000r/min 离心 10min, 取上清液待测。

血清样品: 取血 0.5mL 室温静置 10min, 2000r/min 离心 10min, 取上清液待测。

1.3.4.1.1.3.2 标准曲线制作

将 10nmol/mL 四乙氧基丙烷, 用双蒸水稀释成 0.0、0.25、0.5、1.0、1.5、2、3、5、10nmol/mL 分别取 0.1mL 加入酸水解液 2mL、TBA 工作液 0.5mL→混匀, 避光、沸水浴 60min→流水冷却至室温→3mL 正丁醇振荡抽提 1min→3000r/min 离心 5min→取上清液 (正丁醇层) 测荧光强度 (入射狭缝 1.5nm, 出射狭缝 5nm, 激发波长 536nm, 发射波长 550nm)

以四乙氧基丙烷浓度为横坐标，荧光强度为纵坐标作图。

1.3.4.1.1.3.3 样品测定

试剂	空白管	样本管	标准管
10mL 具塞离心管	0.1mL 蒸馏水	0.1mL 血清*	0.1mL 标准 [#]
酸水解液	2mL	2mL	2mL
TBA 工作液	0.5mL	0.5mL	0.5mL
混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却			
正丁醇	3mL	3mL	3mL
振荡抽提 1min，3000r/min 离心 5min			

*全血上清液 0.5mL（空白管加蒸馏水 0.5mL，标准管加标准 0.1mL、蒸馏水 0.4mL）

[#] 1nmol/mL 四乙氧基丙烷（标准）

血清 0.1mL（或全血上清液 0.5mL）→加入酸水解液 2mL、TBA 工作液 0.5mL→混匀，避光、沸水浴 60min→流水冷却至室温→3mL 正丁醇振荡抽提 1min→3000r/min 离心 5min→取上清液（正丁醇层）测荧光强度（入射狭缝 1.5nm，出射狭缝 5nm，激发波长 536nm，发射波长 550nm）

1.3.4.1.1.3.4 计算公式：

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 血清)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 1 \times 1$$

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 血液)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 1 \times \frac{1}{0.05}$$

A：空白管荧光度

B：样品荧光度

F：四乙氧基丙烷荧光度

C：四乙氧基丙烷浓度（1nmol/mL）

K：稀释倍数

1.3.4.1.2 比色法

1.3.4.1.2.1 比色法原理

MDA（malondialdehyde）是细胞膜脂质过氧化的终产物之一，测其含量可间接估计脂质过氧化的程度。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 有极大吸收峰。可用分光光度法进行测定。

1.3.4.1.2.2 仪器与试剂

仪器：可见光分光光度计、酶标仪、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管。

试剂：0.2M 乙酸盐缓冲液 pH3.5

0.2M 乙酸溶液 185mL

0.2M 乙酸钠溶液 15mL

1mmol/L 四乙氧基丙烷（贮备液，4℃保存 3 个月），临用前用水稀释成 40nmol/mL

8.1%十二烷基硫酸钠 SDS

0.8%硫代巴比妥酸 TBA

0.2M 磷酸盐缓冲液 pH7.4

0.2M 磷酸氢二钠 1920mL

0.2M 磷酸二氢钾 480mL

1.3.4.1.2.3 实验步骤

1.3.4.1.2.3.1 样品制备

溶血液样品：取血 20μL 加入 0.98mL 蒸馏水制成 2%溶血液。

1.3.4.1.2.3.2 样品测定

试剂	空白管	样品管	标准管
2%溶血液*		0.2mL	
40nmol/mL 四乙氧基丙烷			0.2mL
8.1%SDS	0.2mL	0.2mL	0.2mL
0.2M 乙酸盐缓冲液	1.5mL	1.5mL	1.5mL
0.8%TBA	1.5mL	1.5mL	1.5mL
H ₂ O	0.8mL	0.6mL	0.6mL

混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却，于 532nm 比色

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

*若用血清，样品管 0.15mL，标准管 0.15mL。

1.3.4.1.2.3.3 计算

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 2\%溶血液)} = \frac{B - A}{F - A} \times C \times K = \frac{B - A}{F - A} \times 40 \times 1$$

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 血清)} = \frac{B - A}{F - A} \times C \times K = \frac{B - A}{F - A} \times 40 \times 1$$

A: 空白管吸光度

B: 样品吸光度

F: 四乙氧基丙烷吸光度

C: 四乙氧基丙烷浓度 (40nmol/mL)

K: 稀释倍数

1.3.4.2 组织中过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 含量测定

1.3.4.2.1 原理

见 1.3.4.1.2.1

1.3.4.2.2 仪器与试剂

仪器：可见光分光光度计、酶标仪、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管、组织匀浆器

试剂：见 1.3.4.1.2.2

1.3.4.2.3 实验步骤

1.3.4.2.3.1 样品制备

组织匀浆样品：取一定量的所需脏器，生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎，置匀浆器中，加入 0.2M 磷酸盐缓冲液，以 20000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复进行 3 次，制成 10%组织匀浆（W/V），3000r/min 离心 5—10min，取上清液待测。

1.3.4.2.3.2 样品测定

试剂	空白管	样品管	标准管
10%组织匀浆		0.2mL	
40nmol/mL 四乙氧基丙烷			0.2mL
8.1%SDS	0.2mL	0.2mL	0.2mL
0.2M 乙酸盐缓冲液	1.5mL	1.5mL	1.5mL
0.8%TBA	1.5mL	1.5mL	1.5mL
H ₂ O	0.8mL	0.7mL	0.7mL
混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却，于 532nm 比色			

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行

1.3.4.2.3.3 计算

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mg 组织)} = \frac{B - A}{F - A} \times C \times K = \frac{B - A}{F - A} \times 40 \times \frac{1}{0.2 \times 10\% \times 1000}$$

A：空白管吸光度

B：样品管吸光度

F：四乙氧基丙烷吸光度

C：四乙氧基丙烷浓度（40nmol/mL）

K：稀释倍数

1.3.4.3 血清中 8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）测定

1.3.4.3.1 原理

8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）是体内脂质氧化应激反应稳定而具有特异性的标志物，其含量能间接反应因机体内自由基的产生而导致组织细胞的脂质过氧化程度。

1.3.4.3.2 仪器与试剂

仪器：酶标仪、生化培养箱、微量振荡器、微量加样器、洗板机

试剂：8-Isoprostane KIA Kit (酶联免疫试剂盒)

8-Isoprostane EIA 抗体血清、8-Isoprostane AChE 示踪物、8-Isoprostane EIA 标准品、EIA 缓冲液、

洗涤缓冲液、吐温 20、鼠抗-兔 IgG 抗体、EIA 示踪染色剂、EIA 抗体血清染色剂、Ellman's 试剂

1.3.4.3.3 实验步骤

1.3.4.3.3.1 样品制备

小鼠眼内眦静脉丛取血，3000r/min 离心 10min。取上清液，用 EIA 缓冲液稀释 15 倍备用。

1.3.4.3.3.2 样品测定

按试剂盒说明操作。

8-表氢氧-异前列腺素标准孔浓度分别为：500 pg/mL、200 pg/mL、80 pg/mL、32 pg/mL、12.8 pg/mL、5.1 pg/mL、2.0 pg/mL、0.8pg/mL

步骤	试剂	空白	TA	NSB	B ₀	标准/样品
1.加试剂	EIA 缓冲液	-	-	100μL	50μL	-
	标准/样品	-	-	-	-	50μL
	AChE 示踪物	-	-	50μL	50μL	50μL
	抗体血清	-	-	-	50μL	50μL
2.培养	用封板膜盖好酶标板，并在 4℃避光条件下培养 18 小时					
3.清洗	清洗所有反应孔五次					
4.加试剂	AChE 示踪物	-	5μL	-	-	-
	Ellman's	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL
5.培养	用封板膜盖好酶标板，并在常温避光条件下培养 45—90 分钟					
6.读数	在波长 412nm 处测量各孔吸光度（B ₀ 在 0.3—1.0 A.U 范围）					

$$\%B/B_0 = \frac{\text{标准或样品孔吸光度} - \text{NSB 孔吸光度}}{\text{B}_0 \text{孔吸光度} - \text{NSB 孔吸光度}} \times 100$$

以标准物的浓度的对数（log）为横坐标，%B/B₀为纵坐标绘制标准曲线，亦可将数据转换成 logit(B/B₀)或 ln[B/B₀/(1-B/B₀)]作为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。将样品的%B/B₀值，代入方程式，计算出样品的浓度，再乘以稀释倍数，即为样品中的 8-表氢氧-异前列腺素浓度。

1.3.5 蛋白质氧化产物测定

H₂O₂或 O₂^{·-} 自由基对蛋白质氨基酸侧链的氧化可导致羰基产物的积累。羟自由基也可直接作用于肽链，使肽链断裂，引起蛋白质一级结构的破坏，在断裂处产生羰基。羰基化蛋白极易相互交联、聚集为大分子从而降低或失去原有蛋白质的功能，蛋白质羰基含量可直接反映蛋白质损伤的程度。蛋白质羰基形成是多种氨基酸在蛋白质的氧化修饰过程中的早期标志，它随着年龄的增长而增加。

1.3.5.1 血清中蛋白质羰基测定

1.3.5.1.1 原理

被氧化后的蛋白质羰基含量增多，羰基可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙，2,4-二硝基苯腙为红棕色的沉淀，将沉淀用盐酸胍溶解后即可在分光光度计上读取 370 nm 下的吸光度值，从而测定蛋白质的羰基含量。

1.3.5.1.2 仪器与试剂

仪器：紫外分光光度计、酶标仪、微量加样器、生化培养箱、恒温水浴锅、低温高速离心机、混旋器、2mL 离心管。

试剂：10 mmol/L 2,4-二硝基苯肼(DNPH)

99 mg 2, 4-二硝基苯肼用50ml 2 mol/L HCL 溶解，4℃避光保存。

2 mol/L HCL

200 g/L 三氯乙酸（TCA）

6 mol/L 盐酸胍

无水乙醇乙酸乙酯混合应用液

将无水乙醇和乙酸乙酯按照体积比1：1的比例配置成混合溶液，现用现配。

1.3.5.1.3操作步骤

试剂	测定管	对照管
血清（血浆）	0.1mL	0.1mL
10 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼	0.4mL	
2 mol/L HCL		0.4mL
涡旋混匀1分钟，37℃准确避光反应30分钟		
200 g/L 三氯乙酸	0.5mL	0.5mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
6 mol/L 盐酸胍	1.25mL	1.25mL
混匀后，37℃准确水浴15分钟		

涡旋混匀，将全部沉淀溶解，以12000r/min离心15min，取上清液在370nm处比色，6 mol/L盐酸胍试剂调零，测定OD值。用双缩脲法测定血清（或血浆）蛋白质含量。

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

1.3.5.1.4 计算公式

$$\text{蛋白质羰基含量 (nmol/mgprot)} = \frac{\text{测定管OD}-\text{对照管OD}}{22 \times \text{比色光径 (cm)} \times \text{样本蛋白浓度 (mg/L)}} \times 125 \times 10^5$$

1.3.5.2 组织中蛋白质羰基测定

1.3.5.2.1 原理

见1.3.5.1.1

1.3.5.2.2 仪器与试剂

仪器：紫外分光光度计、酶标仪、微量加样器、生化培养箱、恒温水浴锅、天平、匀浆器、低温高速离心机、混旋器、2mL 离心管。

试剂：

10 mmol/L HEPES缓冲液 pH7.4

2.38 g N-2-羟乙基哌嗪-2'-乙磺酸(HEPES)溶于1000mL双蒸馏水，用1N NaOH 调pH至7.4, 4℃保存。

100 g/L 硫酸链霉素

1g硫酸链霉素，溶于10mL双蒸馏水，4℃避光保存。

10 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼(DNPH)

99 mg 2, 4-二硝基苯肼用50mL 2 mol/L HCL 溶解，4℃避光保存。

2 mol/L HCL

200 g/L 三氯乙酸(TCA)

6 mol/L 盐酸胍

无水乙醇乙酸乙酯混合应用液

将无水乙醇和乙酸乙酯按照体积比 1：1 的比例配置成混合溶液，现用现配。

1.3.5.2.3 实验步骤

1.3.5.2.3.1 样品处理

取 0.1g 组织，在冰的生理盐水中漂洗，以去掉表面的血迹。加入 0.9mL 的冰的 10 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH7.4)，制成 10%的匀浆。将匀浆液以 3000r/min 的转速，离心 10 min，保留上清。取 100g/L 的硫酸链霉素溶液 50μL，加入上清液 450μL (v/v,1:9)，室温放置 10 min 后，以 11000r/min 的转速，离心 10 min，取上清液待测。

1.3.5.2.3.2 操作步骤

试剂	测定管	对照管
组织匀浆上清液	0.1mL	0.1mL
10 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼	0.4mL	
2 mol/L HCL		0.4mL
涡旋混匀1分钟，37℃准确避光反应30分钟		
200 g/L 三氯乙酸	0.5mL	0.5mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL

涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
6 mol/L 盐酸胍	1.25mL	1.25mL
混匀后，37℃准确水浴15分钟		

涡旋混匀，将全部沉淀溶解，以12000r/min离心15min，取上清液在370nm处比色，6 mol/L盐酸胍试剂调零，测定OD值。用双缩脲法测定匀浆上清液蛋白质含量。

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

1.3.5.2.3.3计算公式

$$\text{蛋白质羰基含量 (nmol/mgprot)} = \frac{\text{测定管OD-对照管OD}}{22 \times \text{比色光径 (cm)} \times \text{样本蛋白浓度 (mg/L)}} \times 125 \times 10^5$$

1.3.5.3 注意事项

1.3.5.3.1 加入硫酸链霉素：在匀浆上清液中加入硫酸链霉素溶液的作用是沉淀核酸。核酸中的一些碱基如鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶等也含有羰基，如不去除核酸，这些碱基就会与DNPH结合，并反应生成有色物质，这些物质会增加最后溶液的吸光度，使结果偏大。

1.3.5.3.2 DNPH的溶解：DNPH不溶于水，只能溶于稀酸和稀碱等溶液，因此，用2 mol/L HCl来溶解DNPH。设对照管是为了避免HCl与反应液中一些物质反应生成对比色有影响的物质。

1.3.5.3.3 反应体系应避免光：当蛋白质溶液中加入DNPH进行反应时，反应体系需置于黑暗中，因为DNPH不稳定，见光会分解。如果反应体系遇到光，DNPH分解，体系中会有剩余的没有变成蛋白质胍衍生物，对反应比色有影响。

1.3.5.3.4 去除未与蛋白质结合的DNPH：由于DNPH在370nm左右有强烈的光吸收，因而用乙醇和乙酸乙酯混合物反复洗涤沉淀，去掉未与蛋白质结合的DNPH，否则，会增加吸光值。

1.3.6 抗氧化酶活力测定

SOD催化超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 生成 H_2O_2 ，再由其它抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和过氧化氢酶作用生成水，这样可以清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 对细胞的毒害作用。SOD、GSH-Px 在动物某些器官和人体血红细胞中的含量均有明显的增龄变化，酶活性与生物年龄的增长成反比。消除自由基的能力与酶活性成正比。

1.3.6.1 血或组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力测定

1.3.6.1.1 原理

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 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 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 后形成的亚硝酸盐减少。

1.3.6.1.2 仪器与试剂

仪器 可见光分光光度计、酶标仪、离心机、恒温水浴、匀浆器

试剂 65mM 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH7.8

10mmol/L 盐酸羟胺

盐酸羟胺 6.95mg，加 PBS 至 10mL

7.5mmol/L 黄嘌呤

黄嘌呤 11.41mg，加 0.1M NaOH 2.5mL 溶解，加 PBS 至 10mL

0.2g/L 黄嘌呤氧化酶

取 10g/L 黄嘌呤氧化酶 0.2mL 加冰冷 PBS 9.8mL 至 10mL

0.1%甲萘胺

取 0.2g α-甲萘胺溶于 40mL 沸蒸馏水，凉至室温加 50mL 冰醋酸，再加 110mL 凉蒸馏水至 200mL

0.33%对氨基苯磺酸

取 0.66g 对氨基苯磺酸溶于 150mL 温蒸馏水，加 50mL 冰醋酸至 200mL

SOD 标准品

三氯甲烷

95%乙醇（v/v）

0.9%生理盐水

1.3.6.1.3 实验步骤

红细胞抽提液制备：10μL 全血冲入 0.5mL 生理盐水，2000r/min 离心 3min，弃上清，加冰冷的双蒸水 0.2mL 混匀，加入 95%乙醇 0.1mL，振荡 30s，加入三氯甲烷 0.1mL，置快速混合器抽提 1min，4000r/min 离心 3min，分层，上层为 SOD 抽提液，中层为血红蛋白沉淀物，下层为三氯甲烷，记录上清液体积待测。

组织匀浆的制备：剪取一定量的所需脏器，生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎，至玻璃匀浆器中加入冷生理盐水 20000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复进行三次，制成 1%组织匀浆，（最好用超声波发生器处理 30s），使线粒体振破，以中性红—詹纳氏绿 B 染色证明线粒体已振碎。以 4000r/min 离心 5min，取上清液 20μL 待测。

SOD 标准抑制曲线 将 SOD 标准品用磷酸盐缓冲液配制成 750U/mL 的溶液，再稀释到 50 倍，即 SOD 量为 15U/mL（1.5μg/mL），用本法测定不同量的 SOD 标准液的百分抑制率，以百分抑制率为纵坐标，以 SOD 活力单位 U/mL 为横坐标绘制标准曲线。

$$\text{SOD 百分抑制率} = \frac{\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%$$

计算每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个单位。

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{(\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}) \times 100\%}{50\%} \times \frac{\text{反应液总量 (6mL)}}{\text{取液量}} \times \text{样品稀释倍数}$$

也可用酶比活法即以每管样品的百分抑制率从 SOD 标准曲线查出相应的 SOD U/mL，乘以稀释倍数（1mL/取样量）。

若样品为组织匀浆液，根据匀浆浓度或组织蛋白质含量，将单位换算为 U/g 组织或 U/mg 蛋白。若样品为红细胞抽提液，根据血红蛋白含量，可换算为 U/g Hb。

样品测定步骤：

试剂	测定管	对照管
1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.8（mL）	1.0	1.0
样品	A*	

10mmol/L 盐酸羟胺 (mL)	0.1	0.1
7.5mmol/L 黄嘌呤 (mL)	0.2	0.2
0.2mg/mL 黄嘌呤氧化酶 (mL)	0.2	0.2
双蒸水 (mL)	0.49	0.49
混匀, 37℃恒温水浴 30min		
0.33%对氨基苯磺酸 (mL)	2.0	2.0
0.1%甲萘胺 (mL)	2.0	2.0
混匀 15min 后, 倒入 1cm 光径比色杯, 以蒸馏水调零, 530nm 处比色测定 OD 值。		

* A 所用样品的量

红细胞抽提液	10 μ L
血清 (或血浆)	20—30 μ L (溶血样品剔除)
1%组织匀浆	10—40 μ L

注: 如用试剂盒, 可按试剂盒的操作要求进行。

1.3.6.2 血或组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力测定

1.3.6.2.1 原理

谷胱甘肽过氧化物酶 (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系统。对防止体内自由基引起膜脂质过氧化特别重要, 其活力以催化 GSH 氧化的反应速度, 及单位时间内 GSH 减少的量来表示, 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。

1.3.6.2.2 试剂和仪器

仪器: 可见光分光光度计、酶标仪、低温高速离心机、匀浆器、恒温水浴锅、微量加样器

试剂: 叠氮钠磷酸缓冲液 pH7.0

NaN ₃	16.25mg	终浓度 2.5mmol/L
EDTA-Na ₂	7.44mg	终浓度 0.2mmol/L
Na ₂ HPO ₄	1.732g	终浓度 0.2mol/L
NaH ₂ PO ₄	1.076g	终浓度 0.2mol/L

加蒸馏水至 100mL, 用少量 HCl、NaOH 调 pH7.0, 4℃保存。

1mmol/L 谷胱甘肽 (还原型 GSH) 溶液

GSH 30.7mg 加叠氮钠磷酸缓冲液至 100mL, 临用前配制, 冰冻保存 1—2 日。

1.25—1.5mmol/LH₂O₂ 溶液

取 30%H₂O₂ 0.15—0.17mL, 用双蒸水稀释至 100mL, 作为贮备液, 4℃避光保存, 临用前将贮备液用双蒸水稀释 10 倍即可。

偏磷酸沉淀液

HPO ₃	16.7g (先用蒸馏水溶解)
EDTA	0.5g

NaCl 280g

加蒸馏水至 1000mL，用普通滤纸过滤，室温保存。

0.32mol/LNa₂HPO₄ 溶液:

Na₂HPO₄ 22.7g 加蒸馏水至 500mL，室温保存。

DTNB 显色液

DTNB 40mg

柠檬酸三钠 1.0g

加蒸馏水至 100mL，4℃避光保存 1 个月。

0.2M 磷酸缓冲液 pH7.4

0.9%生理盐水

1.3.6.2.3 实验步骤

1.3.6.2.3.1 样品制备

溶血液：取鼠血 10μL 加入到 1mL 双蒸水中，充分振摇，使之全部溶血 1:100 待测，4h 内测定酶活力。若当天来不及测定，将肝素抗凝全血置-20℃冻存，3d 内测定，若 4℃存放，28h 内必须测完。测前取出样品室温自然解冻。

组织上清液：动物禁食过夜，处死后，立即取出所需脏器，放入冷生理盐水中洗去浮血，剔除脂肪及结缔组织，滤纸吸干后，在冰浴上剪成碎块，称取适量组织，加冷 0.2M 磷酸缓冲液，以 20000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复 3 次制成 5%组织匀浆，操作在冰浴中进行，匀浆以 12500×g 离心 10min（低温高速离心机），以沉淀为破碎的细胞、细胞碎片、核及线粒体，上清液用以测胞液中的酶活力，最好当天测，否则加 20%（v/v）甘油分装于塑料管，放置-20—-80℃，可保存数周，而酶活力不减。

1.3.6.2.3.2 GSH 标准曲线的制作：

取 1.0mmol/LGSH 溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL，分别置于 10mL 小容器瓶中，各加入偏磷酸沉淀剂 8mL，用双蒸水稀释至 10mL 刻度，即得到浓度为 0、20、40、60、80、100μmol/L 的 GSH 标准液。

取上述不同浓度标准液各 2mL，放入试管中，加入 0.32mol/L Na₂HPO₄ 2.5mL，比色前加入 DTNB 显色液 0.5mL 用光径 1cm 杯，5min 内在可见光 423nm 波长测 OD 值，以双蒸水调零点。

以 GSH 含量（μmol/L）为横坐标，OD₄₂₃ 值为纵坐标，绘制标准曲线。

1.3.6.2.3.3 测定步骤：

试剂	样品管（mL）	非酶管（mL）	空白管（mL）
1.0mmol/LGSH	0.4	0.4	
样品**	0.4		
双蒸水*		0.4	
37℃水浴预温 5min			
H ₂ O ₂ （37℃预热）	0.2	0.2	
37℃水浴准确反应 3min（严格控制时间）			
偏磷酸沉淀液	4	4	
3000r/min 离心 10min			

离心上清液	2	2	
双蒸水			0.4
偏磷酸沉淀液			1.6
0.32mol/LNa ₂ HPO ₄	2.5	2.5	2.5
DTNB 显色液	0.5	0.5	0.5

显色反应 1min 后于 423nm 波长（1cm 光径），读 OD 值，5min 之内读数准确。

* 样品为组织上清液时，非酶管改为加热使酶失活的组织上清液。

**溶血液 0.1—0.4mL

组织上清液 1:20 稀释，取稀释液 0.4mL

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

1.3.6.2.3.4 计算

鼠全血 GSH-Px 活力单位 规定每 1mL 全血，每分钟，扣除非酶反应的 log[GSH]降低后，使 log[GSH]降低 1 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{鼠全血 GSH-Px 活力单位 (U/mL 全血)} &= \frac{\text{非酶管 log[GSH]} - \text{样品管 log[GSH]}}{3\text{min} \times 0.004\text{mL}} \\ &= \frac{\log[\text{非酶管 OD} - \text{空白管 OD}] - \log[\text{样品管 OD} - \text{空白管 OD}]}{3\text{min} \times 0.004\text{mL}} \end{aligned}$$

组织 GSH-Px 比活力单位 规定每毫克蛋白质，每分钟，扣除非酶反应，使 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位。

$$\text{组织 GSH-Px 比活力单位 (U/mg 蛋白)} = \frac{(\text{非酶管 OD} - \text{样品管 OD}) \times A^{**} \times 5}{3\text{min} \times \text{样品蛋白质的 mg 数}^*}$$

* Folin 法或双缩脲法测样品蛋白质含量

标准 GSH 浓度 (μmol/L)
** A = $\frac{\text{标准 GSH 浓度}}{\text{标准 GSH 光密度 (OD)}}$ 即标准曲线斜率。

1.3.6.2.4 注意事项

1.3.6.2.4.1 由于 H₂O₂ 易分解导致浓度改变，临用时取贮备液用分光光度计测其浓度，取贮备液 3mL，测定 1cm 光径的 240nm 处 OD 值。

$$\text{浓度 (mmol/L)} = \frac{\text{OD}}{0.036 \text{ (消光系数)}}$$

若 OD 值为 0.45，则表明 H₂O₂ 浓度为 12.5mmol/L。

1.3.6.2.4.2 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子的显色不仅与整个反应体系中氢离子浓度有关，还受反应时间限制。加入显色剂后，反应体系 pH 为 6.5 时，11min 开始显色，此时比色 5min 内读数准确。

1.3.7 抗氧化物质还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定

谷胱甘肽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，是 GSH-Px 和 GST 两种酶类的底物，为这两种酶分解氢过氧化物所必需，它能稳定含巯基的酶，和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，GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。

1.3.7.1 血或组织中还原型谷胱甘肽（GSH）测定方法

1.3.7.1.1 原理

GSH 和 5,5'-二硫对硝基甲酸（DTNB）反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色的 5-硫代 2-硝基甲酸阴离子，于 420nm 波长有最吸收峰，测定该离子浓度，即可计算 GSH 的含量。

1.3.7.1.2 仪器和试剂

仪器：可见光分光光度计、酶标仪、低温高速离心机、匀浆器、恒温水浴锅、微量加样器

试剂：0.9%生理盐水

4%磺基水杨酸溶液

0.1mol/L PBS 溶液（pH=8.0）：

称取 Na_2HPO_4 13.452g， KH_2PO_4 0.722g，加蒸馏水至 1000mL。

0.004%DTNB 溶液：

称取 DTNB 40mg 溶于 1000mL 的 0.1mol/L PBS 溶液（pH=8.0）中。

叠氮钠缓冲液：

NaN_3 16.25 mg

EDTA- Na_2 7.44 mg

Na_2HPO_4 1.732 g

NaH_2PO_4 1.076 g

加蒸馏水至 1000mL，用少量 HCl、NaOH 调 pH7.0，4℃ 保存。

标准溶液：称取还原型 GSH 15.4mg，加叠氮钠缓冲液至 50mL，终浓度为 1mmol/L，临用前配制。

1.3.7.1.3 实验步骤

1.3.7.1.3.1 样品制备：

溶血液上清液：取 0.1mL 抗凝全血加双蒸水 0.9mL（1：9 溶血液），充分混匀，直至透亮为止。取溶血液 0.5mL 加 4%磺基水杨酸 0.5mL 混匀，室温下 3500rpm 离心 10 分钟，取上清液备用。

血清上清液：取 0.1mL 血清加 4%磺基水杨酸 0.1mL 混匀，室温下 3500rpm 离心 10 分钟，取上清液备用。

组织上清液：取组织 0.5g 加生理盐水 4.5mL 充分研磨成细浆（10%肝匀浆），混匀后取浆液 0.5mL 加 4%磺基水杨酸 0.5mL 混匀，室温下 3500rpm 离心 10 分钟，取上清液备用。

1.3.7.1.3.2 样品测定：

溶血液或组织样品测定：

	测定管	空白管
上清液	0.5mL	—
4%磺基水杨酸	—	0.5mL
DTNB	4.5mL	4.5mL

混匀，室温放置 10 分钟后，420nm 处测定吸光度。

血清样品测定：

	测定管	空白管
上清液	0.1mL	—
4%磺基水杨酸	—	0.1mL
DTNB	0.9mL	0.9mL

混匀，室温放置 10 分钟后，420nm 处测定吸光度。

注：该指标检测，需新鲜样品取材后当天完成。用双缩脲法测定血清（或溶血液）、组织匀浆蛋白质含量。如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

1.3.7.1.3.3 标准曲线

取 1mmol/L GSH 标准溶液 0、10、20、50、100、150、200 μ L，分别加入生理盐水至 0.5mL，即得到 0、20、40、100、200、300、400 μ mol/L 的 GSH 标准液系列，各管加入 DTNB4.5mL，混匀，室温放置 10 分钟后，空白管调零，420nm 处测定吸光度。以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，做标准曲线。

	1	2	3	4	5	6	7
1mmol/L GSH (mL)	0	0.01	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20
生理盐水 (mL)	0.50	0.49	0.48	0.45	0.40	0.35	0.30
DTNB (mL)	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
GSH 量 (μ mol/L)	0	20	40	100	200	300	400

1.3.7.1.3.4 计算

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times$ 溶血液稀释倍数 $\times$ 上清液稀释倍数
 (μ mol /L 全血) = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times 10 \times 2$

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times$ 上清液稀释倍数
 (μ mol /L 血清) = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times 2$

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times$ 上清液稀释倍数 $\div$ 上清液组织含量
 (μ mol /g 组织) = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times 2 \div 100$ g 组织/L

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times$ 上清液稀释倍数 $\div$ 上清液蛋白含量
 (μ mol /gprot) = 对应曲线浓度值 (μ mol/L) $\times 2 \div$ 匀浆 gprot/L

1.4 数据处理与结果判定

1.4.1 数据处理

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：

各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

1.4.2 指标判定

1.4.2.1 脂质氧化产物

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，过氧化脂质（丙二醛或 8-表氢氧-异前列腺素）含量降低有统计学意义，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。

1.4.2.2 蛋白质氧化产物

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，蛋白质羰基含量降低有统计学意义，判定该受试样品有降低蛋白质过氧化作用，该项指标结果阳性。

1.4.2.3 抗氧化酶活力

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，抗氧化酶（SOD 或 GSH-Px）活力升高有统计学意义，判定该受试样品有升高抗氧化酶活力作用，该项指标结果阳性。

1.4.2.4 抗氧化物质 GSH

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，判定该受试样品有升高抗氧化物质 GSH 作用，该项指标结果阳性。

1.4.3 结果判定

过氧化脂质含量、蛋白质羰基、抗氧化酶活性、还原型谷胱甘肽四项指标中三项指标阳性，可判定该受试样品有助于抗氧化动物实验结果阳性。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

选年龄在 18—65 岁，身体健康状况良好，无明显脑、心、肝、肺、肾、血液疾患，无长期服药史，志愿受试保证配合的人群。

2.2 排除受试者标准

2.2.1 妊娠或哺乳期妇女，对保健食品过敏者。

2.2.2 合并有心、肝、肾和造血系统等严重疾病患者。

2.2.3 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。

2.2.4 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。

2.3 受试者分组

对受试者按 MDA、SOD、GSH-Px 水平随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、生活饮食习惯等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4 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 3 个月，必要时可延长至 6 个月。试验期间对照组和试食组原生活、饮食不变。

2.5 观察指标

各项指标在试验开始及结束时各检测 1 次。

2.5.1 安全性指标

2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查

2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查

2.5.2 功效指标

2.5.2.1 过氧化脂质含量 观察试验前后 MDA 的变化及 MDA 下降百分率。（测定方法见 1.3.4.1）

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

观察试验前后 8-Isoprostane 的变化及 8-Isoprostane 下降百分率。（测定方法见 2.8）

$$\text{8-Isoprostane 下降百分率} = \frac{\text{试验前 8-Isoprostane} - \text{试验后 8-Isoprostane}}{\text{试验前 8-Isoprostane}} \times 100\%$$

2.5.2.2 超氧化物歧化酶 观察试验前后 SOD 的变化及 SOD 升高百分率。（测定方法见 1.3.6.1）

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

2.5.2.3 谷胱甘肽过氧化物酶 观察试验前后 GSH-Px 的变化及 GSH-Px 升高百分率。（测定方法见 2.7）

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

2.6 数据处理和结果判定

凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。在试验前组间比较差异无显著性的前提下，可进行试验后组间比较。

各功效观察指标试验前后自身比较和试食后组间比较均有统计学意义，方可判定该指标阳性。

过氧化脂质含量、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶三项实验中任二项实验结果阳性，可判定该受试样品具有有助于抗氧化作用。

2.7 血中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力测定

2.7.1 原理

谷胱甘肽过氧化物酶 (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系统。对防止体内自由基引起膜脂质过氧化特别重要, 其活力以催化 GSH 氧化的反应速度, 及单位时间内 GSH 减少的量来表示, 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。

2.7.2 试剂和仪器

仪器: 可见光分光光度计、酶标仪、恒温水浴锅、微量加样器、离心机

试剂: 叠氮钠磷酸缓冲液 pH7.0

NaN ₃	16.25mg	终浓度 2.5mmol/L
EDTA-Na ₂	7.44mg	终浓度 0.2mmol/L
Na ₂ HPO ₄	1.732g	终浓度 0.2mol/L
NaH ₂ PO ₄	1.076g	终浓度 0.2mol/L

加蒸馏水至 100mL, 用少量 HCL、NaOH 调 pH7.0, 4℃ 保存。

1mmol/L 谷胱甘肽 (还原型 GSH) 溶液

GSH 30.7mg 加叠氮钠磷酸缓冲液至 100mL, 临用前配制, 冰冻保存 1—2 日。

1.25—1.5mmol/L H₂O₂ 溶液

取 30%H₂O₂ 0.15—0.17mL, 用双蒸水稀释至 100mL, 作为贮备液, 4℃ 避光保存, 临用前将贮备液用双蒸水稀释 10 倍即可。

偏磷酸沉淀液

HPO ₃	16.7g (先用蒸馏水溶解)
EDTA	0.5g
NaCl	280g

加蒸馏水至 1000mL, 用普通滤纸过滤, 室温保存。

0.32mol/L Na₂HPO₄ 溶液:

Na₂HPO₄ 22.7g 加蒸馏水至 500mL, 室温保存。

DTNB 显色液

DTNB	40mg
柠檬酸三钠	1.0g

加蒸馏水至 100mL, 4℃ 避光保存 1 个月。

2.7.3 实验步骤

2.7.3.1 样品制备

溶血液: 取血 20μL 加入到 1mL 双蒸水中, 充分振摇, 使之全部溶血 1:100 待测, 4 小时内测定酶活力。

若当天来不及测定，将肝素抗凝全血置-20℃冻存，3 天内测定，若 4℃存放，28 小时内必须测完。测前取出样品室温自然解冻。

2.7.3.2 GSH 标准曲线的制作

取 1.0mmol/L GSH 溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL，分别置于 10mL 小容器瓶中，各加入偏磷酸沉淀剂 8mL，用双蒸水稀释至 10mL 刻度，即得到浓度为 0、20、40、60、80、100μmol/L 的 GSH 标准液。

取上述不同浓度标准液各 2mL，放入试管中，加入 0.32mol/L Na₂HPO₄ 2.5mL，比色前加入 DTNB 显色液 0.5mL 用光径 1cm 杯，5min 内在可见光 423nm 波长测 OD 值，以双蒸水调零点。

以 GSH 含量 (μmol/L) 为横坐标，OD₄₂₃ 值为纵坐标，绘制标准曲线。

2.7.3.3 测定步骤：

试剂	样品管 (mL)	非酶管 (mL)
1.0mmol/L GSH	0.4	0.4
血样稀释液	0.4	
双蒸水 *		0.4
37℃水浴预温 5min		
H ₂ O ₂ (37℃预热)	0.2	0.2
37℃水浴准确反应 5min (严格控制时间)		
偏磷酸沉淀液	4	4
3000r/min 离心 10min		
离心上清液	2	2
双蒸水		
偏磷酸沉淀液		
0.32mol/L Na ₂ HPO ₄	2.5	2.5
DTNB 显色液	0.5	0.5

显色反应 1min 后于 423nm 波长 (1cm 光径)，读 OD 值，5min 之内读数准确。

2.7.3.4 计算

全血 GSH-Px 活力单位 规定每 8μL 全血，在 37℃反应 5min，扣除非酶反应后，使 GSH 浓度降低 1μmol/L 浓度为一个酶活力单位。

全血 GSH-Px 活力 U/mL 血 = (非酶管 OD - 样品管 OD) × A* × 5**

* A = $\frac{\text{标准 GSH 浓度 } (\mu\text{mol/L})}{\text{标准 GSH 光密度 (OD)}}$ 即标准曲线的斜率

** 5 换算成 1mL 反应液中 GSH 浓度时，需乘以稀释倍数 5

2.7.3.5 注意事项

2.7.3.5.1 由于 H₂O₂ 易分解导致浓度改变，临用时取贮备液用分光光度计测其浓度，取贮备液 3mL，测定 1cm 光径的 240nm 处 OD 值。

OD

$$\text{浓度 (mmol/L)} = \frac{\text{OD}}{0.036 \text{ (消光系数)}}$$

若 OD 值为 0.45，则表明 H_2O_2 浓度为 12.5mmol/L。

2.7.3.5.2 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子的显色不仅与整个反应体系中氢离子浓度有关，还受反应时间限制。加入显色剂后，反应体系 pH 为 6.5 时，11min 开始显色，此时比色 5min 内读数准确。

2.8 血清中 8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）测定

2.8.1 原理

8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）是体内脂质氧化应激反应稳定而具有特异性的标志物，其含量能间接反应因机体内自由基的产生而导致组织细胞的脂质过氧化程度。

2.8.2 仪器与试剂

仪器：酶标仪、生化培养箱、微量振荡器、微量加样器、洗板机

试剂：8-Isoprostane KIA Kit (酶联免疫试剂盒)

8-Isoprostane EIA 抗体血清、8-Isoprostane AChE 示踪物、8-Isoprostane EIA 标准品、EIA 缓冲液、洗涤缓冲液、吐温 20、鼠抗-兔 IgG 抗体、EIA 示踪染色剂、EIA 抗体血清染色剂、Ellman's 试剂

2.8.3 实验步骤

2.8.3.1 样品制备

静脉取血，3000r/min 离心 10min。取上清液，用 EIA 缓冲液稀释 15 倍备用。

2.8.3.2 样品测定

按试剂盒说明操作。

8-表氢氧-异前列腺素标准孔浓度分别为：500 pg/mL、200 pg/mL、80 pg/mL、32 pg/mL、12.8 pg/mL、5.1 pg/mL、2.0 pg/mL、0.8pg/mL

步骤	试剂	空白	TA	NSB	B ₀	标准/样品
1.加试剂	EIA 缓冲液	-	-	100μL	50μL	-
	标准/样品	-	-	-	-	50μL
	AChE 示踪物	-	-	50μL	50μL	50μL
	抗体血清	-	-	-	50μL	50μL
2.培养	用封板膜盖好酶标板，并在 4℃ 避光条件下培养 18 小时					
3.清洗	清洗所有反应孔五次					
4.加试剂	AChE 示踪物	-	5μL	-	-	-
	Ellman's	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL
5.培养	用封板膜盖好酶标板，并在常温避光条件下培养 45—90 分钟					
6.读数	在波长 412nm 处测量各孔吸光度（B ₀ 在 0.3—1.0 A.U 范围）					

$$\%B/B_0 = \frac{\text{标准或样品孔吸光度} - \text{NSB 孔吸光度}}{\text{B}_0 \text{孔吸光度} - \text{NSB 孔吸光度}} \times 100$$

以标准物的浓度的对数（log）为横坐标，%B/B₀为纵坐标绘制标准曲线，亦可将数据转换成 logit(B/B₀) 或 ln[B/B₀/(1-B/B₀)]作为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。将样品的%B/B₀值，代入方程式，计算出样品的浓度，再乘以稀释倍数，即为样品中的 8-表氢氧-异前列腺素浓度。

三、辅助改善记忆检验方法

1 动物实验

1.1 跳台实验

1.1.1 原理

反应箱底铺有通 36v 电的铜栅，动物受到电击，其正常反应是跳上箱内绝缘的平台以避免伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上，受到电击又迅速跳回平台，如此训练 5min，并记录每鼠受到电击的次数或叫错误次数，以此作为学习成绩。24h 或 48h 重作测验，此即记忆保持测验。记录受电击的动物数、第一次跳下平台的潜伏期和 3min 内的错误总数。停止训练 5 天后（也可以在训练后的一周、两周或其它时间点）进行记忆消退实验。

1.1.2 仪器与试剂

跳台仪：该装置为 $10 \times 10 \times 60\text{cm}^3$ 的被动回避条件反射箱，用黑色塑料板分隔成 5 间。底面铺以铜栅，间距为 0.5cm，可以通电，电压强度由一变压器控制。每间左后角置一高和直径均为 4.5cm 的绝缘平台。

试剂：樟柳碱、东莨菪碱、环己酰亚胺、乙醇。

1.1.3 实验方法

1.1.3.1 实验动物 推荐使用近交系小鼠。断乳鼠或成年鼠（18—22g）。用于改善老年人记忆的产品必须采用成年鼠。雌雄均可，单一性别，每组 10—15 只。

1.1.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.1.3.3 实验方法及步骤

1.1.3.3.1 受试样品对正常小鼠记忆的影响

末次给样后次日（或一次给样后 1h）开始训练。将动物放入反应箱内（台上、台下）适应环境 3min，然后将动物放置反应箱内的铜栅上，立即通以 36v 的交流电。动物受到电击，其正常反应是跳回平台（绝缘体），以躲避伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上，受到电击又迅速跳回平台上。训练一次后，将动物放在反应箱内的平台上，记录 5min 内各鼠跳下平台的错误次数和第一次跳下平台的潜伏期，以此作为学习成绩。24 或 48h 后进行重测验，将小鼠放在平台上，记录各鼠第一次跳下平台的潜伏期、各鼠 3min 内电击次数和受电击的动物数总数，同时计算出现错误反应的动物的百分率（受电击的动物数占该组动物总数的百分率）。停止训练 5 天后（包括第 5 天）可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验（方法同重测验）。

1.1.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型小鼠的影响

1.1.3.3.2.1 造模

记忆获得障碍模型制造：训练前 10min 腹腔注射樟柳碱或东莨菪碱 5mg/kg BW；

记忆巩固障碍模型制造：训练前 10min 腹腔注射环己酰亚胺 120mg/kg BW；

记忆再现障碍模型制造：重测验前 30min 灌胃 30% 的乙醇 10mL/kg BW。

1.1.3.3.2.2 记忆测试的操作方法：同 1.1.3.3.1。

1.1.4 数据处理及结果判定

潜伏期结果为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

错误次数和 3min 内跳下平台的动物数均为记数资料，可用 χ^2 检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

若受试样品组与对照组比较，潜伏期明显延长，错误次数或跳下平台的动物数明显少于对照组，差异有显著性，以上三项指标中，任一项指标阳性，均可判定该项实验阳性。

1.1.5 注意事项

1.1.5.1 动物在 24h 内有其活动周期，不同时相处于不同的觉醒水平，故每次实验应选择同一时相（上午 8—12 点或下午 1—4 点）。

1.1.5.2 实验应在隔音，光强度和温、湿度适宜且保持一致的行为实验室进行。

1.1.5.3 推荐使用纯系动物，实验前数天将动物移至实验室以适应周围环境。

1.1.5.4 实验者必须每天与动物接触，如：喂水、喂食和抚摸动物。

1.1.5.5 减少非特异性干扰，如：情绪、注意、动机、觉醒、运动活动水平、应激和内分泌等因素。

1.1.5.6 考虑动物种属差异。

1.2 避暗法

1.2.1 原理

利用小鼠嗜暗的习性设计一个装置，一半是暗室，一半是明室，中间有一小洞相连。暗室底部铺有通电的铜栅，并与一计时器相连，计时器可自动记录潜伏期的时间。小鼠进入暗室即受到电击，计时自动停止。

1.2.2 仪器和试剂

避暗仪：该装置分明暗两室。明室大小为 $12\text{cm} \times 4.5\text{cm}$ ，其上方约 20cm 处悬一 40w 钨灯丝。暗室较大，大小为 $17\text{cm} \times 4.5\text{cm}$ ，两室之间有一直径约 3cm 的圆洞。两室底部均铺以铜栅。暗室底部中间位置的铜栅可以通电，电击强度可在旋钮上任意选择。一般采用 40v 电压。暗室与一计时器相连，计时器可自动记录潜伏期的时间。

试剂：樟柳碱、东莨菪碱、环己酰亚胺、乙醇。

1.2.3 实验方法

1.2.3.1 实验动物 同 1.1.3.1

1.2.3.2 剂量设计和分组 同 1.1.3.2

1.2.3.3 实验方法及步骤

1.2.3.3.1 受试样品对正常小鼠记忆的影响

末次给样后次日（或一次给样后 1h）开始训练。实验时将小鼠面部背向洞口放入明室，同时启动计时器。动物穿过洞口进入暗室受到电击，计时器自动停止，取出小鼠，记录每鼠从放入明室至进入暗室遭电击所需的时间，此即潜伏期，训练 5min，并记录 5min 内电击次数。24h 或 48h 后重作测验，记录每只动物进入暗

室的潜伏期和 5min 内的电击次数，并计算 5min 内进入暗室（错误反应）的动物百分率。停止训练 5 天后可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验。

1.2.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型小鼠的影响：

1.2.3.3.2.1 模型制造：方法同 1.1.3.3.2.1

1.2.3.3.2.2 操作方法：同 1.2.3.3.1

1.2.4 数据处理及结果判定

潜伏期时间为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

5min 内进入暗室的次数和 5min 内进入暗室的动物数均为计数资料，可用 χ^2 检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

若受试样品组小鼠进入暗室的潜伏期明显长于对照组，5min 内进入暗室的错误次数或 5min 内进入暗室的动物数少于对照组，且差异有显著性，以上三项指标中任一项指标阳性，均可判定该项实验阳性。

1.2.5 注意事项：同 1.1.5

1.3 穿梭箱实验（双向回避实验）

1.3.1 原理：条件反射

1.3.2 仪器与试剂

仪器：大鼠穿梭箱。该装置由实验箱和自动记录打印装置组成。实验箱大小为 50cm×16cm×18cm。箱底部格栅为可以通电的不锈钢棒，箱底中央部有一高 1.2cm 挡板，将箱底部分隔成左右两侧。实验箱顶部有光源和蜂鸣音控制器，自动记录打印装置可连续自动记录动物对电刺激（灯光或/和蜂鸣器）的反应和潜伏期，并将结果打印出来。

试剂：樟柳碱，东莨菪碱，环己酰亚胺，乙醇

1.3.3 实验方法

1.3.3.1 实验动物 Wistar 或 SD 大鼠，断乳鼠或成年鼠，雄、雌均可。

1.3.3.2 剂量设计和分组 同 1.1.3.2。

1.3.3.3 实验方法及步骤

1.3.3.3.1 受试样品对正常大鼠条件反射建立的影响

末次给样后次日（或一次给样后 1h）开始训练。将大鼠放入箱内任何一侧，20s 后开始呈现灯光或蜂鸣音，持续 20s，后 10s 内同时给以电刺激（100V，0.2mA，50Hz，AC）。大鼠在遭电击后即逃避，必须跑到对侧顶端，挡住光电管后才可中断电击，此为被动回避反应，在每次电击前给予条件刺激，反复强化后，大鼠在接受条件刺激后即跳向对侧并挡住光电管而逃避电击，此为主动回避反应，每隔天训练一回，每回 50 次，连续训练 4—5 回后，动物的主动回避反应率可达 80—90%以上。根据打印结果分析如下指标：动物反应次数，动物主动回避时间，动物被动回避时间，动物主动回避率。停止训练 5—50 天内，分 2—3 次测定其记忆消退情况。

1.3.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型大鼠条件反射建立的影响

1.3.3.3.2.1 模型制造：同 1.1.3.3.2.1

1.3.3.3.2.2 操作方法：同 1.3.3.3.1。

1.3.4 数据处理及结果判定

动物主动回避时间和被动回避时间为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

若实验组主动和/或被动回避时间明显短于对照组，差异有显著性，可判定为该指标阳性。

1.3.5 注意事项 同 1.1.5。

1.4 水迷宫实验

1.4.1 原理

动物都有一种“探索”和“更替”倾向，当离开一个臂时，总是跑向“久”未跑过的“新”臂。小鼠不愿在水中，因而寻找能爬出水面的阶梯，训练后，小鼠能记住找到阶梯的路线。

1.4.2 仪器与试剂

水迷宫自动记录仪。该仪器是由迷宫游泳箱和自动记录仪两部分组成。迷宫游泳箱由聚乙烯塑料制成，长 100cm、宽 100cm、高 30cm；内径长 90cm、宽 90cm、高 30cm，泳道宽 12cm，泳道走向固定。见附图。

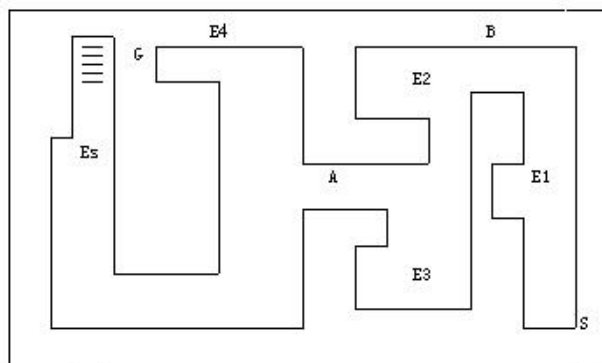
1.4.3 实验方法

1.4.3.1 实验动物 推荐使用近交系小鼠，断乳鼠或成年鼠，单一性别，雌雄均可。

1.4.3.2 剂量设置、给样途径和期限 均同 1.1.3.2。

1.4.3.3 实验方法

1.4.3.3.1 受试样品对正常小鼠记忆的影响



连续给样 30 天，末次给样次日开始训练。训练期间继续给样，每天一次。迷宫泳道水深 9cm，水温约 20℃（ $\leq 15^\circ\text{C}$ ）。将小鼠训练时间限定为 2min，在 2min 内未到达终点的小鼠均记为 2min。

第一次训练前将小鼠放在梯子附近，使其自动爬上 3 次。以后每次训练前将小鼠放在梯子附近，背朝楼梯，使其自动爬上 1 次。实验分阶段进行，视动物学习成绩逐步加长路程。第一次训练时用一挡板在 A 处档死，从 A 处开始训练，记录从 A 点到达终点的时间。第二次训练加长路程，从 B 处开始，此路程约训练 3

次，至动物数 80%以上在 2min 内达到终点后再延长路程，分别记录各鼠每次从 B 点到达终点所需的时间和发生错误的次数（进入任何一个盲端一次均算一次错误）。末次测试从起点进行，将小鼠放在起点，记录从起点到达终点所需的时间和发生错误的次数。每次训练时，对 2min 内未达到终点的小鼠，应引导其到达终点，从终点的楼梯上来，达到训练的目的。每次训练或测验时均将头朝起始点。最后计算各组动物 5 次训练和测试的总错误次数，到达终点的总时间及 2min 内到达终点的总动物数（百分率），停止训练 5 天后可在不同的时间从起点进行消退实验。

1.4.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型小鼠的影响

1.4.3.3.2.1 模型制造方法:同 1.1.3.3.2.1

1.4.3.3.2.2 操作方法:同 1.4.3.3.1。

1.4.4 数据处理及结果判定

到达终点的时间属计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

错误次数和到达终点的动物数（百分率）两指标为计数资料，可用 χ^2 检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

试验组与对照组比，试验组到达终点所用的时间或到达终点前的错误次数明显少于对照组，或 2min 内到达终点的动物数明显多于对照组，且经统计学检验差异有显著性。其中任一项指标为阳性，可判为该项实验阳性。

1.4.5 注意事项

1.4.5.1 训练时在目标区（终点）停留的时间不能太短，否则失去强化效果。

1.4.5.2 每天训练结束后，要对实验箱进行清洗，以清除动物留下的气味。

1.4.5.3 实验前可对动物进行初筛，经训练后，2min 内仍不能游至终点者淘汰。

1.4.5.4 其余同 1.1.5。

记忆测试指标一览表

	测 试 项 目	评 价 指 标	所用仪器
被 动 回 避	跳台实验	被动回避时间、错误次数和动物出现错误反应百分率	跳台仪
	避暗实验	同上	避暗仪
主 动 回 避	单向回避实验	达标所需的训练次数	穿梭箱
	双向回避实验	回避时间和回避率	穿梭箱
迷 宫 试	水迷宫实验	到达安全台的时间和达标所需的训练次数、动物出现错误反应的动物百分率	水迷宫仪

1.5 结果判定

跳台实验、避暗实验、穿梭箱实验、水迷宫实验四项实验中任二项实验结果阳性。且重复实验结果一致（所重复的同一项实验两次结果均为阳性），可以判定该受试样品辅助改善记忆动物实验结果阳性。

2 人体试食试验

2.1 改善记忆的保健食品人体试食试验的一般原则

2.1.1 受试者应本着自觉自愿的原则。

2.1.2 应以保障受试者的健康为前提。

2.1.3 主试者必须经过必要的培训。

2.2 选择受试者的原则

2.2.1 从比较集中、各方面影响因素大致相同的群体中挑选受试者，比如学校、部队或其它群体。

2.2.2 文化程度基本一致。

2.2.3 属同一年龄组，如不在同一年龄组，则应对量表分进行校正。

2.2.4 未接受过类似测试。

2.2.5 排除短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断。

2.3 试验设计和分组

2.3.1 试验原则：对照、双盲、随机

2.3.2 对照：记忆测试是一种心理测试，易受迁移学习和心理暗示的影响，第二次测验的记忆商一般比第一次高，有时对照组前后两次测试的记忆商差异有显著性，因此，不能仅以服样前后自身比较的结果下结论，必须设置平行对照。

2.3.3 双盲：对照组必须服用安慰剂（不含有效成分，但其剂型、色泽、外观、口感、包装等均与受试样品相同），以消除心理暗示的影响；主试者在施测时不知道谁服样品，谁服安慰剂，以消除主试者主观偏向的影响，保证测试结果客观可靠。

2.3.4 同一受试者前后两次测试由同一主试者进行。

2.3.5 施测顺序一般是先听觉测验后视觉测验。具体测验顺序是：（1）指向记忆，（2）联想学习，（3）无意义图形再认，（4）图象自由回忆，（5）人像特点联系回忆。

2.3.6 分组方法：服样前对受试者进行第一次记忆商测试后，然后按记忆商随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如文化水平、年龄等，进行均衡性检验，以保证组间可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.3.7 受试样品的剂量和使用方法：试食组按样品的推荐剂量和方法服用受试样品，对照组服用安慰剂。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

2.4 观察指标

2.4.1 安全性指标

2.4.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、心率等（儿童只要求进行心肺听诊、肝脾触诊等一般体

格检查)

2.4.1.2 血、尿常规检查

2.4.1.3 肝、肾功能检查(儿童受试者不测定此项)

2.4.1.4 胸片、心电图、腹部B超检查(成人受试者测定此项且仅试验前检查一次)

2.4.2 功效指标:使用临床记忆量表。用测试后的各分测验原始分查量表分,各分测验量表分相加得总量表分,用总量表分查记忆商。

2.4.2.1 指向记忆量表分

2.4.2.2 联想学习量表分

2.4.2.3 图象自由回忆量表分

2.4.2.4 无意义图形再认量表分

2.4.2.5 人像特点联系回忆量表分

2.4.2.6 记忆商

2.5 试验材料

2.5.1 电子储存设备

2.5.1.1 指向记忆和联想学习的指导语和刺激词。

2.5.1.2 图象自由回忆、无意义图形再认、人像特点联系回忆的指导语(详细内容见后)。

2.5.2 图片材料(分甲、乙两套)

2.5.2.1 无意义图形再认 备第一次呈现用目标刺激图片20张,备第二次再认时呈现用目标刺激和混入刺激图片各20张,共40张,合计60张图片。

2.5.2.2 图象自由回忆物象图片 两组各15张,共30张。

2.5.2.3 人像特点联系回忆 备第一次呈现用的黑白勾画人面像6张,备回忆时呈现的人面像6张,两者内容相同,顺序不同,共计12张;每张人像图片背面标有该人像的姓氏、职业、爱好、特点。

2.5.3 录音机、秒表、记录纸。

2.6 测试内容及方法:统一使用临床记忆量表,具体方法参见临床记忆量表。

临床记忆量表有五项测试内容:

指向记忆

联想学习

图象自由回忆

无意义图形再认

人像特点联系回忆

临床记忆量表的特点是备有有文化和无文化两个部分的正常值,便于检测无文化者。临床记忆量表共包括5个分量表。各分测验的测试顺序(如图象自由回忆的图片呈现顺序)在所有受试者中应一致。

2.6.1 指向记忆:包括两组内容,每组24个词,每词由2—3个字组成,以1秒的速度读出,两个词之间间隔2s,其中有12个词属于同一类别,即为指向词;另12个混在其中相类似的词,为非指向词。(例如甲套第一组词中有12个词属于水果类,混杂的词有粽子、年糕、冰糖等12个食品类词;第二组词中有12个词

属于动物类，混杂的词有皮肤、尾巴、眼睛、耳朵等身体器官类词 12 个。）要求受试者记忆指定的同类别词（如水果）。24 个词随机排列，用播放设备放送，每组词全部放送完毕后，要求受试者立即回忆，说出要求记忆的一类词（不一定要按放送的顺序回忆）。主试者按受试者回忆的顺序，将所说出的内容在记录纸上按顺序用数字记在相应词下面的方格内，并记录总的反应时间，如果受试者说出的不是放送的词内容（称为“添加性错误”），则写在记录纸上该组词后面空格内。如果说的是混杂进去的不需记忆的词，则记在下面非指向栏内相应词下，亦算错误。反应时间从主试者说：“现在请您回答”算起，直到回忆结束。允许回忆时间不超过 2min。

当第一组词受试者回忆结束后，间隔 5s，再重复一遍指导语，然后放送第二组词，方法同前。在第二组词回忆完毕后，询问受试者“除了要求您记的动物（或穿戴）这类词以外，您还记得别的词吗？”这就是“非指向记忆”结果，可记录在表内混杂词下面的方格内。这里要注意在第一组词回忆完毕时，不要做这样的询问，否则将引起受试者在识记第二组词时把注意力指向识记包括指向和非指向在内的所有词，那就不符合这项测验的原意了。最后询问受试者“用什么方法记忆”。

指导语：“我念一些词，您要注意听，里面有的是水果名字（或动物名字、蔬菜名字、穿戴的东西），有的不是，要求您记住水果名字（或动物名字--天上飞的、地下跑的、爬的，大的、小的都算；蔬菜名字、穿戴的东西）。我念完以后，您要把听过的水果（或动物、蔬菜、穿戴）的名字说出来，不一定按照我念的顺序说，记得什么就先说什么，听明白了吗？现在注意听”。如果指导语没听明白，可以重复口述一遍。口头重复时，指导语不得任意更改，例如，“要求记住水果（或其它）名字”不得改成“只要记住水果名字或光记（或就记）水果名字”，或者甚至加上“不记其它的东西”就更不对了，这会导致不同的结果，是不允许的。计分：以两组指向记忆刺激词的正确回忆数之和来计分，并记录添加性错误的词或其它错误备分析研究用（满分 24 分）。

甲套指向记忆词呈现顺序为：

1. 橘子 香蕉 粽子 石榴 桃子 粉条 年糕 西瓜 葡萄 冰糖 鸭蛋 柿子 茶叶 豆腐 苹果 白酒 牛奶 李子 饼干 杏 花椒 香瓜 木耳 鸭梨
2. 乌鸦 公鸡 耳朵 蜜蜂 兔子 指甲 皮肤 狐狸 麻雀 眼睛 肩膀 青蛙 牙齿 肝脏 苍蝇 翅膀 心脏 老虎 头发 猴子 尾巴 蜻蜓 鼻子 蚂蚁

乙套指向记忆词呈现顺序为：

1. 萝卜 茄子 大麦 韭菜 黄瓜 玉米 松树 扁豆 冬瓜 梅花 稻子 辣椒 荷花 杨树 白菜 桃花 棉花 菠菜 芝麻 西红柿 菊花 芹菜 柳树 豆芽菜
2. 围巾 球鞋 牙膏 裙子 手套 筷子 板凳 短裤 雨衣 铁锅 剪刀 大衣 闹钟 电灯 袜子 火柴 缝纫机 皮袄 刷子 衬衫 扁担 毛裤 扫帚 草帽

2.6.2 联想学习：每套有 12 对由 2 个词组成成对的词，其中容易的（成对联想词间有逻辑联系）与困难的（成对联想词间无逻辑联系）成对词各 6 对，容易联想包括反义词（如困难--容易）、同类词（如太阳--月亮）和从属词（如牲口--牛马）各两对；困难联想包括具体--具体（如西瓜--衣服）、抽象--具体（如勇敢--电灯）和抽象--抽象（如光明--服从）成对词各两对。用以检查对不同成对词的记忆情况。以每对词 3s 的速度读出，两对词之间间隔 2s，12 对词随机排列，用播放设备放送，共放送三遍，即受试者有三次学习机会，但每遍词

放送的顺序不同。每放送一遍后，主试者念每对词的前面一个词（即刺激词），要求受试者答出后面一个词来（即反应词），主试者将结果记录在相应格内。如果回答正确，打“√”号，如果错误，则记录错答之词，没答出来，则以“0”表示。每对词允许回忆时间 5s。最后询问受试者“用什么方法记忆”。

指导语：“我给您念 12 对词，您要注意听，要求您记住哪两个词是连在一起的一对，比如我念‘桌子--马车’，表示‘桌子’和‘马车’是联在一起的一对词。我念完 12 对词以后，就念每对词中的前面一个词，要求您答出和它一对的后面一个词来，比如我念‘桌子’，您就回答（停顿一下，让受试者回忆）‘马车’，听明白了吗？”如果没听明白，可以重复口述一遍。

计分：分为容易、困难以及两者之和三种分数。每遍放送后，对容易的词每答对一个计 0.5 分，6 对共 3 分；困难的词每答对一个计 1 分，6 对共 6 分，6 对容易和 6 对困难词之和为 9 分，三遍的满分为 27 分。

2.6.3 图象自由回忆：包括 2 组画有物体的图片材料，每组 15 张，所画的物体都是人们常见的、熟悉的和易于辨认的东西，如日用品、交通工具等。每张图片呈现 4s、图片间间隔 2s，图片顺序随机排列。15 张图片呈现完毕后，要求受试者立即回忆说出所记得的图片内容（不一定要按刺激呈现的顺序回忆）。主试者按受试者回忆的顺序，将所记得的图片在记录纸上按顺序用数字记在相应图片名称下的方格内，并记录总的反应时间。如果受试者说出的是图片中没有的内容（称为添加性错误），则写在记录纸上该图片系列后面的空格内。反应时从主试者说“现在请您回答”算起，直到回忆结束。允许回忆时间不超过 2min。当第一组图片受试者回忆结束后，间隔 5s，再重复一遍指导语，然后呈现第二组图片，方法同前。最后询问受试者“用什么方法记忆”。

指导语：“我给您看一些图片，您要仔细看，并记住它们是什么，有看不清的可以问，等全部看完后，立即说出您看到的是些什么东西，不一定按照我念的顺序说，记得什么就先说什么，听明白了吗？现在注意看”如果没听明白，可以重复口述一遍，直到受试者理解为止。

计分 以两组图片的正确回忆数之和计分（满分 30 分），并记录添加性错误。

2.6.4 无意义图形再认：包括 20 张目标刺激图片，40 张再认刺激图片（其中与呈现图片相同目标刺激图片 20 张，相似混同刺激图片 20 张）。目标刺激为 5 种形式的无意义图形，即曲线封闭、直线封闭、曲线直线、曲线不封闭、直线不封闭。每种各 4 张，共 20 张。

测验时，先给受试者分别呈现 20 张目标刺激图片，每张呈现 3s，相隔 3s，要求受试者记住这些目标刺激。然后，随机呈现 40 张再认刺激图片（包括目标刺激图片和混同刺激图片），图片随机排列，要求受试者将与目标刺激图片完全相同的图片辨认出来，即每张图片呈现时，回答“看过”或“没看过”，每张允许回忆时间为 5s。如果对目标刺激回答“看过”，则按图片中央 Z 号（从 1—20）在记录纸目标刺激一项相应格内打“√”号，如答“没看过”，则打“×”号。如果对混入刺激回答“没看过”，则按图片中央 Z 号（从 21—40）在记录纸混入刺激一项相应格内打“√”号，如答“没看过”，则打“×”号。最后询问受试者“用什么方法记忆”。

指导语：“我给您看一些由简单的曲线和直线构成的图形，看的时间比较短，您要仔细看，并记住它们的特点，有看不清的可以问，等看完后，我再给您看另一些图片，其中有您看过的，也有您没看过的，它们都很相似，要求您认出哪些是看过的，哪些是没看过的，听明白了吗？现在注意看”。如果没听明白，可以重复口述一遍，直到受试者理解为止。

无意义图形的数字表示

甲 …… …表示甲套	甲 X … …目标刺激呈现时的顺序号
	Z … …表示出现目标刺激顺序（1—20）
	和混入刺激的呈现顺序号（21—40）
X … …呈现的顺序号	Y … …再认时总的顺序号
20 张目标刺激呈现时	40 张图片再认时

计分 再认分 = (正确再认目标刺激 - 错误混入刺激数) × 2 (满分 40 分),

即再认分 = (击中 - 虚报) × 2

对目标刺激回答“看过”，称为“击中”，对没看过的混入刺激也回答“看过”，称为“虚报”。

2.6.5 人像特点联系回忆：包括 6 张黑白人面像图片。按随机顺序排列每张人像分别呈现 9s，间隔 3s，在呈现的同时，告诉受试者每张图片上的人像的姓名、职业和爱好等特点，重复 2 遍，并要求受试者记住人像及特点之间的联系。然后再以另一顺序呈现这些图片，让受试者立即说出人像的姓名、职业和爱好等特点。如果回答正确，主试者在记录纸相应格内打“√”号，回答错误，则记下说错的内容，每张人像允许回忆时间 30s。

指导语：“我给您看一些画的人像，在给您看每张人像的同时，向您介绍他姓什么、职业和爱好特点，请您一边注意看人像，一边注意听介绍，且要把人像和他的三个特点联系起来记忆。看完全部人像后，当我再给您看每一张人像时，要求您立即说出他的三个特点，不一定按我说的顺序回答，记得什么先说什么，听明白了吗？”如果没听明白，可以重复口述一遍，直到受试者理解为止。

计分 分别记录回忆出的姓名、职业和爱好的数目，每个姓名记 2 分，每项职业和爱好各记 1 分，然后以三项总和计分（满分 24 分）。

临床记忆量表的 5 个分量表都有各自的记分方法，各分量表得出的分数均为原始分。根据这些原始分，换算量表分的等价值表，查出各分量表的量表分，计算出总量表分；然后按照不同的年龄组的总量表分的等值记忆商数换算表，即可查得记忆商数（MQ）。这就作为衡量人的记忆水平的指标。

2.7 数据处理及结果判定

此试验数据为计量资料，对两组各分测验量表分和记忆商可用 t 检验进行分析。自身对照可以采用配对 t 检验，组间平行比较采用两样本均数的 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布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后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

结果判定：在试验前两组记忆商均衡的前提下，试食后试食组的记忆商高于对照组，且差异有显著性，同时试食组试验后的记忆商高于其试验前的记忆商，且差异有显著性，可以判定该受试样品具有辅助改善记忆的作用。

2.8 注意事项

2.8.1 心理测验必须由受过训练的人员进行，否则影响试验结果。

2.8.2 测试应当在一个安静的房间内进行。除受试者和主试者外，尽量避免有其它人在场。

2.8.3 本量表内有三项和视觉有关的分测验，室内光线必须保证能看得清楚刺激图片。尽量排除因听力或视力不佳而影响记忆成绩。

2.8.4 必须注意受试者受测时的精神状态，测验需在受试者情绪正常、不反对接受测试、注意力比较集中的情况下进行。受试者是否疲倦，注意力是否集中，是否配合、对测试是否紧张，是否有信心等均需记录在记录纸的首页上。

2.8.5 同一受试者的测试要求一次做完。在用年龄量表分比较分测验成绩时，必须注意不同分测验是否在相同的精神状态下进行的。

2.8.6 填写记录必须认真，字迹清楚。填写时注意以下几点：

2.8.6.1 首页必须逐项填写，即受试者的姓名、性别和年龄，以及检查日期和时间。

2.8.6.2 填写文化程度和职业作为了解受试者接受测验的背景材料。

2.8.6.3 填写健康状况或诊断，前一夜睡眠情况或当时疲倦与否。

2.8.6.4 对表明当时精神状况的各项，如配合程度、注意力、紧张状态、信心等也要填写清楚。

2.8.6.5 除记录受试者记忆回答的正误外，应当记下错误回答的具体内容，以备分析研究用。

2.8.6.6 是否应用记忆方法以及使用什么方法对记忆研究是有益的。在用此量表进行研究时应当记录此项。

2.8.6.7 各项分测验成绩的原始分记入首页总结表中，要先经复查，复查无误方可填入原始分项内。

四、缓解视觉疲劳检验方法

1 受试者纳入标准

- 1.1 18 岁—65 岁的成人。
- 1.2 长期用眼，视力易疲劳者。

2 受试者排除标准

- 2.1 患有感染性、外伤性眼部疾患者。进行眼部手术不足 3 个月者。
- 2.2 患有角膜、晶体、玻璃体、眼底病变等内外眼疾患者。
- 2.3 患有心血管、脑血管、肝、肾、造血系统等疾病者。
- 2.4 妊娠或哺乳期妇女、过敏体质患者。
- 2.5 短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判定者。
- 2.6 长期服用有关治疗视力的药物，保健品或使用其他治疗方法未能终止者。
- 2.7 不符合纳入标准，未按规定食用受试物者，或资料不全等影响功效或安全性判断者。

3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。根据随机、双盲的要求进行分组，分组时根据症状及视力检查情况，使试食组和对照组的症状及视力水平均衡。同时要考虑年龄、性别等因素，使两组具有可比性。试食试验结束时每组受试者人数不少于 50 例。

4 受试物的剂量和使用方法

试食组按推荐方法和推荐量服用受试物，对照组服用安慰剂。受试物服用时间为连续 30 天，必要时可延长至 60 天。

5 观察指标

5.1 安全性指标

- 5.1.1 血、尿常规检查，体格检查。
- 5.1.2 肝、肾功能检查。
- 5.1.3 胸片、心电图、腹部 B 超检查（于试食前检查一次）。

5.2 功效性指标：于试食开始及结束时检查。

- 5.2.1 问卷调查：症状询问、用眼情况。
- 5.2.2 眼科检查：包括眼底检查、视力检查（近视、远视、散光等）。
- 5.2.3 明视持久度（测定方法见附录）。

6 功效判定标准

6.1 症状改善有效率

眼酸痛、眼胀、畏光、视物模糊、眼干涩、异物感、流泪，全身不适 8 种症状中有 3 种改善，且其他症状无恶化即判定症状改善。计算两组症状改善例数和两组症状改善有效率。症状改善有效率（%）计算方法为症状改善例数/试食例数×100。将两组症状改善有效率进行统计学检验。

6.2 症状平均积分

计算每位试食者试食前后的症状积分，分别计算两组的平均积分值，并进行统计学检验。

表 1 视觉疲劳症状判定方法（半定量积分法）

症状 / 积分	0	1 分	2 分	3 分
眼胀	无	偶感眼胀	时有眼胀，休息后好转	经常眼胀，休息后改善
眼酸痛	无	偶感隐痛	时有眼痛	经常眼痛
畏光	无	偶有畏光	时有畏光	经常畏光
视物模糊	无	偶有模糊	时有模糊，休息后缓解	经常模糊，休息后改善
眼干涩	无	偶有干涩	时有干涩	经常干涩
异物感	无	偶有异物感	时有异物感	经常异物感
流泪	无	偶有流泪	时有流泪	经常流泪
与视觉疲劳相关的全身不适	无	偶有全身不适	时有全身不适	经常全身不适

注：“偶感”是指 1—2 次 / 2 天；“时有”是指 1—3 次 / 天；“经常”是指 >3 次 / 天

6.3 视力改善率

为参考指标。以试食后较试食前提高两行为改善，统计两组服用受试物后的视力改善率作为参考指标。参考指标不作为对缓解视觉疲劳是否有效的判定标准。

6.4 明视持久度

试食组自身比较或试食组与对照组组间比较，明视持久度差异有显著性（ $P < 0.05$ ），且平均明视持久度提高大于等于 10% 为有效。

7 数据处理和统计分析

计量资料可用 t 检验进行分析。自身对照采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验。对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验。在试食前组间比较差异无显著性的前提下，可进行试验后组间比较。

计数资料可用 χ^2 检验。四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论频数等于或小于 1 时，

应改用确切概率法。

8 结果判定

8.1 试食组自身比较或试食组与对照组组间比较，症状改善有效率且症状总积分差异有显著性 ($P<0.05$)。

8.2 试食组自身比较或试食组与对照组组间比较，明视持久度差异有显著性 ($P<0.05$)，且平均明视持久度提高大于等于 10%。

具备 8.1 及 8.2 且视力改善率不明显降低，可判定该受试物具有缓解视觉疲劳的作用。

明视持久度测定

此法是用以评价视觉疲劳的一种方法。当人大脑皮质兴奋性降低时，视觉分析功能下降，眼睛注视对象物的过程中，不能明视的时间增加，能明视的时间减少。这种明视时间对注视时间的百分比称为明视持久度，它是综合反映视功能和心理功能的一种指标。

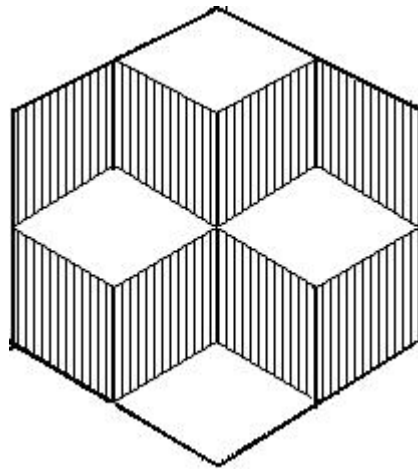
明视持久度的测定方法如下：

在检查表上绘制“品”字形立体方块图，方块每边长 1cm，局部照明 100 LX—150 LX（可使用专门制作的灯箱）。测定时，检查表与眼睛的距离应按照受试者视物习惯保持在适当距离不动，规定受试者看到“品”字图像视为明视，倒“品”字时为不明视。测定时间为 3min。

检查时让受试者手持能断续计时的秒表，检查者发出开始的口令后，受试者立即注视方块中的图案（或打开灯箱开关），同时开动手中的秒表计时。在注视过程中看到倒“品”字时立即按下秒表的暂停开关；看到又呈“品”字图像时再开动秒表，如此反复进行。测定到规定时间 3min 结束时受试者听到检查者的口令立即停止秒表，这段时间内秒表走过的读数就是受试者看成“品”字图像的总时间，即明视时间。

明视持久度=（明视时间/注视总时间）×100%

测定时应注意场地和照明，还与受试者受试前的用眼程度有关，实验前应注意。



明视持久度测定用“品”字图

五、清咽润喉检验方法

1 动物实验

1.1 大鼠棉球植入实验

1.1.1 实验原理

采用棉球作为异物植入动物局部皮下，可引起与临床某些炎症后期病理变化相似的肉芽组织增生。比较给予受试样品后，实验组动物与对照组动物肉芽肿重量的差异，以确定受试样品是否具有干预慢性炎症（肉芽肿形成）的作用。

1.1.2 实验动物

推荐使用成年雄性大鼠，体重 150—220 克。每组 8—12 只。

1.1.3 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个空白对照组，三个剂量组中应包括一个人体推荐量 5 倍的剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.1.4 仪器和材料

手术器械、恒温干燥箱、分析天平、注射器、乙醚（或异氟烷）、碘伏、脱脂棉、脱毛器

1.1.5 实验步骤

1.1.5.1 棉球的处理 将脱脂棉制成约 20~25mg 紧致的小棉球，经高压灭菌后，置恒温干燥箱 60℃ 干燥 3h，取出无菌条件下称重，干燥保存，备用。

1.1.5.2 肉芽肿的形成和测定

实验结束前 8 天，用脱毛器脱去大鼠两侧腹股沟处的毛，乙醚（或异氟烷）浅麻醉大鼠，碘伏消毒，在无菌条件下切开大鼠两侧腹股沟皮肤，植入备用的棉球，缝合切口，继续给予受试物。实验结束当天，给受试物 1 小时后，断颈处死大鼠，在原缝合处剪开皮肤，剥离并取出棉球肉芽组织，置于已称重洁净平皿中，恒温干燥箱 60℃ 开盖干燥 1 小时后称重，计算肉芽肿净量。

$$\text{肉芽肿净量 (mg)} = \text{干燥后棉球肉芽肿重量} - \text{原棉球重量}$$

1.1.6 数据处理和结果判定

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 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），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。

结果判定：实验组与空白对照组比较，肉芽肿净量明显下降，经统计处理差异有显著性，可判定该受试样品大鼠棉球植入实验结果阳性。

1.1.7 注意事项

1.1.7.1 所用棉球重量及表面积对实验结果影响较大，故在实验中，应尽可能保证所用棉球重量和表面积近似。

1.1.7.2 尽量使手术切口的大小一致，以减少差异。

1.1.7.3 植入棉球后，将切口缝合牢固，以免在实验过程中棉球脱落，影响实验结果。

1.2 大鼠足趾肿胀实验

1.2.1 实验原理

一定量致炎剂注入大鼠后肢足趾皮下，可造成足趾肿胀。测定足趾容积，比较致炎剂作用前后实验组和对照组足趾容积的变化，以确定受试样品是否具有干预急性炎症（足趾肿胀）的作用。

1.2.2 实验动物

同 1.1.2。

1.2.3 剂量分组及受试样品给予时间

同 1.1.3

1.2.4 仪器和材料：

致炎剂（推荐使用葡聚糖 4 万）、足趾容积测量仪、无菌蒸馏水、0.25mL 注射器。

1.2.5 实验步骤

1.2.5.1 致炎剂的配制 用无菌蒸馏水配制浓度为 1%的葡聚糖 4 万，备用。

1.2.5.2 足趾肿胀及测定 实验结束当天再给受试样品一次，1 小时后，用足趾容积测量仪测量各组大鼠右后足趾的容积，作为 0 小时足趾容积。然后在大鼠右后足趾皮下注入 1%葡聚糖 4 万 0.1mL/只，分别于 1、2、4、6 小时测量大鼠足趾的容积，同一部位测量 3 次，取平均值。以不同时间所测足趾容积与致炎剂作用前的足趾容积之差为肿胀值，计算各个时间段的足趾肿胀率。

$$\text{肿胀率}(\%) = \text{肿胀值} / \text{致炎前足趾容积} \times 100\%$$

1.2.6 数据处理和结果判定

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 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），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。

结果判定：实验组与空白对照组比较，任一时间点刺激前后足趾容积肿胀率明显减少，差异有显著性，可判定该受试样品大鼠足趾肿胀实验结果阳性。

1.2.7 注意事项

1.2.7.1 致炎剂注入的质量对实验结果影响很大，注入致炎剂时，应将动物后肢拉直，从右后足掌心向踝关节方向皮下注射致炎剂，并应尽可能使动物不动。建议由专人负责致炎剂的注射，以保证实验结果的一致性。

1.2.7.2 测量足趾容积时，严格按仪器说明操作。注意应在鼠足某处用记号笔画线作为测量标线，将鼠足缓缓放入测量筒内，当水平面与鼠足上的测量标线重叠时，踏动脚踏开关，记录足趾容积，用吸水纸擦干鼠足上的水后，分别再进行第 2 次和第 3 次测定。为避免测量误差，测定人员应事先进行训练，掌握将鼠足放入测量筒内的最佳方式，每个样品的测量最好由专人进行。

1.2.7.3 每次测定的部位要固定。

1.3 小鼠耳肿胀实验

1.3.1 实验原理

二甲苯为无色澄清液体，涂抹于小鼠耳廓后，由于其刺激作用，可引起鼠耳局部毛细血管充血，通透性增加，导致急性炎症。比较实验组和对照组二甲苯作用后耳肿胀率的差异，以确定受试样品是否具有干预急性炎症（小鼠耳肿胀）的作用。

1.3.2 仪器和材料

直径 9mm 打孔器、致炎剂（二甲苯）、微量加样器、分析天平

1.3.3 实验动物

推荐使用近交系雄性小鼠，体重 18—22 克，每组 10—15 只。

1.3.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个空白对照组，三个剂量组中应包括一个人体推荐量 10 倍的剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.3.5 实验步骤

汲取二甲苯 20 μ L，滴加在小鼠右耳外侧面耳廓的中央，让其自由扩散，30 分钟后，将小鼠脱颈椎处死，剪下双耳，用 9mm 直径打孔器在两耳相同部位打下耳片并称重，以两耳重量之差为耳廓肿胀值，计算耳廓肿胀率。

$$\text{耳廓肿胀率}(\%) = \text{耳廓肿胀值} / \text{对照耳片重量} \times 100\%$$

1.3.6 数据处理和结果判定

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 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），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。

结果判定：实验组与空白对照组比较，耳廓肿胀率明显减少，差异有显著性，可判定该受试样品小鼠耳肿胀实验结果阳性。

1.3.7 注意事项

1.3.7.1 二甲苯具有对眼及上呼吸道有刺激作用，操作时，操作者应注意自身的防护。

1.3.7.2 打下的耳片应及时称重，以避免水分失去而影响实验结果的准确性。

1.4 结果判定

大鼠棉球植入实验结果阳性，同时大鼠足趾肿胀实验或小鼠耳肿胀实验结果任意一项阳性，可判定该受试样品清咽润喉动物实验结果为阳性。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

2.1.1 体征：慢性咽炎人群，主观症状有咽痛、咽痒、咽干、干咳、异物感、多言加重等。

2.1.2 咽部症状：咽部粘膜水肿、粘膜充血、咽后壁淋巴滤泡增生、分泌物附着。

具有 2.1.1 及 2.1.2 中至少一项检查所见的自愿受试者，即可纳入观察。

2.2 受试者排除标准

2.2.1 慢性咽炎急性发作期或急性咽炎、声带结节、感冒或吸烟因素所致者。

2.2.2 鼻咽、咽、喉、鼻、喉、食管、颈部及结核、转移性肺癌病变所致者。

2.2.3 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上者，妊娠和哺乳期妇女及对受试产品过敏者。

2.2.4 合并有心、脑血管、肝、肾、造血系统、支气管和肺等严重疾病及精神病患者和有睡眠疾病的患者。

2.2.5 短期内已服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断者。

2.2.6 未按规定服用受试样品或中途加服其它药物，无法判断功效或资料不全者。

2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的咽部症状、体征随机分为试食组和对照组，分组时尽可能考虑影响结果的主要因素如病程、年龄、性别等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法和服用量每日服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照，也可使用具有清咽润喉的保健食品作为对照。受试样品给予时间 15 天~30 天。试验期间受试者不改变生活、工作环境，不改变原来生活、饮食习惯。

2.5 观察指标

2.5.1 安全性指标

2.5.1.1 一般状况（包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等）

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查

2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（试验前检查一次）

2.5.2 功效性指标

2.5.2.1 症状观察

准确记录受试者试食前后的咽部主观症状，主要咽部症状包括：咽痛、咽痒、咽干、干咳、异物感多言加重等，按症状轻重计算积分（1 度—1 分，2 度—2 分，3 度—3 分），统计积分变化和症状改善率。

2.5.2.2 体征观察

咽部检查：咽部粘膜充血、粘膜水肿、咽后壁淋巴滤泡增生、分泌物等体征。

按检查结果的轻、中、重分为 I、II、III 级，分别记录试食前后体征变化，计算体征积分和改善率。

观察指标功效判定：

有效：症状减轻 1 度，咽部体征检查结果减轻 I 级

无效：症状、体征均无明显改变

2.6 数据处理和结果判定

积分变化可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

改善率为计数资料，可用 χ^2 检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

结果判定：试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，咽部临床症状、体征积分明显降低，且症状、体征改善率较对照组有明显增加，差异有显著性，可判定该受试样品具有清咽润喉。

2.7 注意事项

因咽部症状检查带有较大的主观性，建议由专人负责所有受试者试食前后的检查，尽可能保证判断标准的一致性。

六、有助于改善睡眠检验方法

1 实验动物

推荐用成年小鼠，单一性别，18—22 克，每组 10—15 只。

2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

3 实验方法

3.1 直接睡眠实验

3.1.1 操作步骤:观察受试组动物给予 3 个剂量的受试样品，对照组给予同体积溶剂后，是否出现睡眠现象。睡眠以翻正反射消失为指标。当小鼠置于背卧位时，能立即翻正身位。如超过 30—60 秒不能翻正者，即认为翻正反射消失，进入睡眠。翻正反射恢复即为动物觉醒，翻正反射消失至恢复这段时间为动物睡眠时间，记录阴性对照组与受试样品组入睡动物数及睡眠时间。

3.1.2 数据处理及结果判定

睡眠时间为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组与一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；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。

入睡动物数为计数资料，用 χ^2 检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

比较对照组与实验组入睡动物数及睡眠时间之间的差异，若入睡动物数或睡眠时间增加有显著性，则实验结果阳性。

3.2 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验

3.2.1 原理

在戊巴比妥钠催眠的基础上，观察受试物是否能延长睡眠时间，若睡眠时间延长，则说明受试物与戊巴比妥钠有协同作用。

3.2.2 试剂

戊巴比妥钠（用前新鲜配制）

3.2.3 操作步骤

做正式实验前先进行预实验，确定使动物 100% 入睡，但又不使睡眠时间过长的戊巴比妥钠剂量（30—60mg/kg BW），用此剂量正式实验。

动物末次给予溶剂及不同剂量受试样品后，出现峰作用前 10—15 分钟，给各组动物腹腔注射戊巴比妥钠，注射量为 0.2mL/20g，以翻正反射消失为指标，观察受试样品能否延长戊巴比妥钠睡眠时间。

3.2.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

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。

比较实验组与对照组睡眠时间延长之间的差异，睡眠时间延长有显著性，则实验结果阳性。

3.3 戊巴比妥钠（或巴比妥钠）阈下剂量催眠实验

3.3.1 原理

观察受试物与戊巴比妥钠（或巴比妥钠）的协同作用。由于戊巴比妥钠通过肝酶代谢，而对该酶有抑制作用的药物，也能延长戊巴比妥钠睡眠时间，所以为排除这种影响，应进行阈下剂量实验。

3.3.2 试剂

戊巴比妥钠（或巴比妥钠），用前新鲜配制。

3.3.3 操作步骤

正式实验前先进行预实验，确定戊巴比妥钠（或巴比妥钠）阈下催眠剂量（戊巴比妥钠 16—30mg/kg BW 或巴比妥钠 100—150mg/kg BW），即 80—90%小鼠翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大阈下剂量。动物末次给予溶剂及不同浓度受试样品后，出现峰作用前 10—15 分钟，各组动物腹腔注射戊巴比妥钠最大阈下催眠剂量，记录 30 分钟内入睡动物数（翻正反射消失达 1 分钟以上者）。实验宜在 24—25℃ 安静环境下进行。

3.3.4 数据处理和结果判定

入睡动物数为计数资料用 χ^2 检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

比较对照组与实验组入睡动物数之间的差异，入睡动物发生率增加有显著性，则实验结果阳性。

3.4 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

3.4.1 原理

在巴比妥钠催眠的基础上，观察受试物是否能缩短入睡潜伏期，若睡眠潜伏期缩短，则说明受试物与巴比妥钠有协同作用。

3.4.2 试剂

巴比妥钠（用前新鲜配制）

3.4.3 操作步骤

做正式实验前先进行预实验，确定使动物 100% 入睡，但又不使睡眠时间过长的巴比妥钠的剂量（200—300mg/kg BW），用此剂量正式实验。

动物末次给予溶剂及不同浓度受试样品 10—20 分钟后，给各组动物腹腔注射巴比妥钠，注射量为 0.2mL/20g，以翻正反射消失为指标，观察受试样品对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响。

3.4.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

比较实验组与对照组睡眠潜伏期之间的差异，睡眠潜伏期缩短有显著性，则实验结果阳性。

4 结果判定

延长戊巴比妥钠睡眠时间实验、戊巴比妥钠（或巴比妥钠）阈下剂量催眠实验、巴比妥钠睡眠潜伏期实验三项实验中二项阳性，且无明显直接睡眠作用，可判定该受试样品具有有助于改善睡眠作用。

5 注意事项

5.1 实验室环境必须安静、恒温、恒湿，以确保条件的恒定。

5.2 由于动物自身固有的生物学特征和习性，对受试样品的反应存在着种属、性别、年龄等方面的差异。一般来说鼠类活动在夜间比白天活跃，雌性比雄性更明显，年龄大的动物中枢神经反应不敏感。这类实验应尽量安排在夜间同一时间进行，室温 24—25℃为宜。

5.3 实验时应使动物在测定室适应数分钟后再进行正式测试，实验组与对照组交叉进行测试。

七、缓解体力疲劳检验方法

动物实验

1 负重游泳实验

1.1 检验原理

运动耐力的提高是抗疲劳能力加强最直接的表现，游泳时间的长短可以反应动物运动疲劳的程度。

1.2 仪器与器材

游泳箱（大小约 50cm×50cm×40cm），电子天平、铅皮。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物 推荐使用纯系小鼠，成年小鼠，体重 18—22g。

1.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.3.3 实验步骤

末次给予受试样品 30min 后（酒类样品测试当天可以不灌胃），将尾根部负荷 5%体重铅皮的小鼠置于游泳箱中游泳。水深不少于 30cm，水温 $25^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ，记录小鼠自游泳开始至死亡的时间，即小鼠负重游泳时间。

1.4 数据处理及结果判定

游泳时间为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。若受试样品组负重游泳时间明显长于对照组，且差异有显著性，可判定该实验结果阳性。

1.5 注意事项

1.5.1 每一游泳箱一次放入的小鼠不宜太多，否则互相挤靠，影响实验结果。

1.5.2 水温对小鼠的游泳时间有明显的影响，因此要求各组水温控制一致，每一批小鼠下水之前都应测量水温，水温以 25°C 为宜，如果过低可能引起小鼠痉挛，影响实验结果，过高（ 30°C ）则游泳时间太长不便于操作。

1.5.3 铅皮缠绕松紧应适宜。

1.5.4 观察者应在整个实验过程中使每只小鼠四肢保持运动。如果小鼠漂浮在水面四肢不动，可用木棒在其附近搅动。

1.5.5 不同批的小鼠因饲养环境、季节等原因的变化体质上会出现差异。因此受试样品组和对照组应采用同一批动物同时进行实验。

2 血清尿素测定

全自动生化仪测定和二乙酰—脲法任选一种。

2.1 全自动生化仪测定：按有关仪器说明书和试剂盒操作。

2.2 二乙酰—脲法

2.2.1 原理

样品中尿素在氯化高铁—磷酸溶液中与二乙酰—脲和硫氨脲共煮，形成一种红色的化合物 Diazine，其颜色的深浅与尿素含量成正比。与同样处理的尿素标准管比较，可求出尿素的含量。

2.2.2 仪器和试剂

2.2.2.1 721 分光光度计，10mL 带塞试管，1mL（或 1.5mL）塑料离心管，电炉，锅，灌胃针头。

2.2.2.2 尿素试剂盒（二乙酰—脲法）：二乙酰—脲应用液、氯化铁—磷酸应用液、尿素标准液（200 mg/L）。

2.2.2.3 若无试剂盒，可自行配制试剂。试剂配制方法如下：

1g/L 二乙酰—脲溶液：取二乙酰—脲 1.0g，氨基硫脲（thiosemicarbazide）0.2g，氯化钠 4.5g，溶于蒸馏水并加至 1000mL。

33g/L 三氯化铁溶液：取三氯化铁 1.0g 溶于浓磷酸 20mL 中，加蒸馏水 10mL，摇匀。

酸溶液：取蒸馏水 800mL，慢慢加入浓硫酸 50mL，边加边摇；再加入 85%磷酸 50mL，摇匀。加入 33g/L 三氯化铁溶液 1.5mL，加水至 1L。

10 mmol/L 尿素标准液（尿素 28.01mg/dL）：精确称取尿素（AR）150.3mg 溶于 16 mmol/L 苯甲酸溶液并加至 250mL。

16 mmol/L 苯甲酸液：取苯甲酸 2.0g 溶于蒸馏水 1000mL 中，加浓硫酸 0.8mL。

2.2.3 实验方法

2.2.3.1 实验动物 成年小鼠或大鼠，小鼠体重 18—22g，Wistar 或 SD 大鼠体重 160—200g。推荐使用雄性小鼠。

2.2.3.2 剂量设计和分组 大鼠以人体推荐量的 5 倍为基本剂量。其余同 1.3.2。

2.2.3.3 实验步骤

2.2.3.3.1 高尿素模型的建立及标本制备：末次给受试样品 30min 后，在温度为 30℃的水中不负重游泳 90min，休息 60min 后采血。大鼠采尾血，小鼠拔眼球采全血约 0.5mL（不加抗凝剂）。置 4℃冰箱约 3h，血凝固后 2000r/min 离心 15min，取血清备用。血清中的尿素在室温下可稳定 24h，在 4—6℃可稳定 7 天以上。用二乙酰—脲法测定。

2.2.3.3.2 试剂盒操作步骤（本推荐使用的试剂盒适用于手工操作）

	测定管	标准管	空白管
尿素标准液（mL）	--	0.02	--
标本（mL）	0.02	--	--
二乙酰脲应用液（mL）	3.00	3.00	3.00
氯化铁—磷酸应用液（mL）	2.50	2.50	2.50

充分混匀，置沸水浴中煮沸 10 分钟，再于冷水中冷却。在 520nm 波长处（或绿色滤光板），以蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

计算公式：

$$\text{尿素（mg/L）} = \frac{\text{测定管光密度} - \text{空白管光密度}}{\text{标准管光密度} - \text{空白管光密度}} \times \text{标准液浓度值} \times 10$$

$$\text{尿素 (mmol/L)} = \frac{\text{测定管光密度} - \text{空白管光密度}}{\text{标准管光密度} - \text{空白管光密度}} \times \text{标准液浓度值} \div 2.8$$

标准液浓度值为 200mg/L。

2.2.3.3.3 自行配制试剂按下表操作：

试剂	测定	标准管	空白管
血浆/血清 (mL)	0.05	—	—
10mmol/L 尿素标准液 (mL)	—	0.05	—
蒸馏水 (mL)	—	—	0.05
1g/L 脲溶液 (mL)	2.5	2.5	2.5
酸溶液 (mL)	2.5	2.5	2.5

充分混匀，置沸水浴准确 15min，立即用自来水冷却。用波长 520nm，以空白管调零，读取各管吸光度 (A 值)。

尿素含量计算

尿素 (mmol/L) = $A_u \times 10 / A_s$

尿素 (mg/dL) = $A_u \times 28.01 / A_s$

式中 A_u —测定管吸光度

A_s —标准管吸光度

2.3 数据处理及结果判定

尿素数据为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

若受试样品组血清尿素低于对照组，且差异有显著性，可判定该实验结果阳性。

2.4 注意事项

2.4.1 为避免色度转移，应在标本加入后 30min 内读出吸光度值。

2.4.2 一般标本测定管反应后应澄清，严重脂血可制备血滤液重新测定。

2.4.3 煮沸时间应准确。

3 肝糖原测定：蒽酮法。

3.1 检测原理

蒽酮可与游离糖或多糖起反应，反应后溶液呈蓝绿色，于 620nm 处有最大吸收。测定其光密度，可以确定糖原的含量。

3.2 仪器和试剂

3.2.1 仪器：721 型分光光度计，离心机，扭力天平，匀浆器，振荡器，移液泵，沸水浴，灌胃针头，手术器械，玻璃漏斗，加样器，2mL、5mL、10mL 吸量管，20mL 带塞刻度试管，10mL 带塞离心管。

3.2.2 试剂：5%三氯醋酸（用蒸馏水配）（TCA），葡萄糖标准液，浓硫酸（AR），蒽酮试剂。

蒽酮试剂：溶液中含 0.05%的蒽酮，1%的硫脲，用 72%的 H_2SO_4 配制。配制方法如下：

①72% H_2SO_4 配制：烧杯中加入 280mL 蒸馏水，再加入浓硫酸 720mL（比重 1.84）。

②蒽酮试剂配法：当 H_2SO_4 温度降至 80—90℃时放入 500mg 蒽酮，10g 硫脲，适当摇动烧杯混匀。冷却后存放于冰箱中，可保存两周。

3.3 实验方法

3.3.1 实验动物 同 2.2.3.1

3.3.2 剂量设计和分组

大鼠剂量以人体推荐食用量扩大 5 倍作为基本剂量，其余同 1.3.2。

3.3.3 实验步骤

末次给样后 30min 处死动物，取肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干，精确称取肝脏 100mg，加入 8mL TCA，每管匀浆 1min，将匀浆液倒入离心管，以 3000r/min 离心 15min，将上清液转移至另一试管内。

取 1mL 上清液放入 10mL 离心管中（每样品可做两平行管以保证获得可靠结果），每管加入 95%的乙醇 4mL，充分混匀至两种液体间不留有界面。用干净塞子塞上，室温下竖立放置过夜（也可选用将试管放在 37—40℃水浴 3h）。沉淀完全后，将试管于 3000r/min 离心 15min。小心倒掉上清液并使试管倒立放置 10min。

用 2mL 蒸馏水溶解糖原，加水时将管壁的糖原洗下。如管底的糖原不立即溶解，振荡管子直到完全溶解。制作试剂空白和标准管：

试剂空白：吸 2mL 蒸馏水到干净离心管。

标准管：吸 0.5mL 葡萄糖标准液（含 100mg/dL 葡萄糖）和 1.5mL 蒸馏水放入同样的管子。

此时将 10mL 蒽酮试剂用力加入各管，液流（蒽酮试剂）直接进入管子中央，保证充分混合好。从管子中注入蒽酮试剂时起，将管子放在冷水龙头下冲凉。在所有管子都达到凉水温度后，将其浸于沸水浴（水浴深度略高于管子液面）15min，然后移到冷水浴。将管内液体移入比色管，在 620nm 波长下，用试剂空白管调零后测定吸光度。根据所称取的肝脏重量换算成肝糖原含量（以 mg/g 肝表示），并进行统计分析。

3.3.3.3 糖原含量计算：

$$\text{每 100 克肝组织中糖原的毫克数} = \frac{\text{DU}}{\text{DS}} \times 0.5 \times \frac{\text{提取液体积}}{\text{肝组织克数}} \times 100 \times 0.9$$

DU：样品管吸光度

DS：标准管吸光度

0.5：为 0.5mL 葡萄糖标准液液中的葡萄糖含量。

0.9：为将葡萄糖换算成糖原的系数。

提取液体积：为 8mL

肝组织克数：为 0.1g

3.4 数据处理及结果判定

肝糖原数据为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

若受试样品组肝糖原含量明显高于对照组，且差异有显著性，可判定该实验结果阳性。

3.5 注意事项

3.5.1 测定的实验方法均为定量要求，因此所有取样加试剂均需准确。

3.5.2 糖原测定中冷却、加热时间与氧化还原作用有关，因此时间要控制准确。

3.5.3 蒽酮显色剂不稳定，以临用时配制为宜，注意避免采用绒布或被污染的糖类进入蒽酮反应。

4 血乳酸测定

4.1 原理

4.1.1 自配试剂测定方法：

在铜离子催化下，乳酸与浓硫酸在沸水中反应，乳酸转化为乙醛，乙醛与对羟基联苯反应产生紫色化合物，在波长 560nm 处有强烈的光吸收，故可进行定量测定。

4.1.2 乳酸盐测定仪测定方法：

检测探头上装有一片三层的膜，其中间层为固定的乳酸盐氧化酶。表面被膜覆盖的探头位于充满缓冲液的样品室内，当样品被注入样品室后，部分底物会渗进膜中；当它们接触到固定酶（乳酸盐氧化酶）时便迅速被氧化，产生过氧化氢。过氧化氢（ H_2O_2 ）继而在铂阳极上被氧化产生电子。当过氧化氢生成率和离开固定膜层的速率达到稳定时便可得到一个动态平衡状态，可用稳态响应表示。电子流与稳态过氧化氢浓度成线性比例，因此与乳酸盐浓度成正比。

4.2 仪器与试剂

4.2.1 仪器：

4.2.1.1 血乳酸测定—自配试剂测定方法：微量吸管，恒温水浴锅，电热水箱，分光光度计。

4.2.1.2 乳酸仪测定方法：乳酸仪、加样器、振荡器。

4.2.2 试剂

4.2.2.1 自配试剂测定方法：

4% $CuSO_4$ 、浓硫酸（AR）、1%NaF 溶液。

蛋白沉淀剂：按体积分别取一份 10%的钨酸钠，一份 1/3 mol/L 硫酸，再与 28 份蒸馏水混合即成。

沉淀剂—NaF 混合液：按体积分别取 3 份沉淀剂，1 份 1%NaF 混合即成。

1.5% 对羟基联苯溶液：称取 1.5g 对羟基联苯溶于 100mL 热的 0.5% NaOH 中（可保存半年）。

乳酸标准储备液（1g/L）：称取 106.6mg 乳酸锂或 171mg 乳酸钙，以 10%的三氯乙酸定容至 100mL（室温下可保存半年）。

乳酸标准应用液（0.01g/L）：准确吸取 1.0mL 乳酸标准储备液稀释定容至 100mL，此液要求现用现配。

4.2.2.2 乳酸仪测定方法：破膜液、磷酸盐缓冲液、氯化钠。

4.3 实验方法

4.3.1 实验动物 同 2.2.3.1

4.3.2 剂量设计和分组：大鼠以人体每日每公斤体重推荐量的 5 倍为基本剂量，其余同 1.3.2。

4.3.3 实验步骤

4.3.3.1 高血乳酸模型的制作及血标本制备：末次给样 30min 后采血，然后不负重在温度为 30℃的水中游泳 10min 后停止。乳酸仪测定方法：在游泳前各采血 20 μ L 加入 40 μ L 破膜液中，立即充分振荡破碎细胞；游泳后立即采血 20 μ L 加入 40 μ L 破膜液中振荡；休息 20min 后再各采血 20 μ L 加入 40 μ L 破膜液中振荡，用乳酸仪测定。自配试剂测定方法同样在上述三个时间点各采血 20 μ L 按以下步骤操作。大鼠采尾血，小鼠用毛细管从内眦采血。

4.3.3.2 测定步骤

4.3.3.2.1 自配试剂测定：于 5mL 试管中加入 0.48mL 1% NaF 溶液，准确吸取全血 20μL 加入试管底部。用试管上清液清洗微量吸管数次，再加入 1.5mL 蛋白沉淀剂，振荡混匀，于 3000r/min 离心 10min，取上清液，按下表操作。

	空白管（mL）	标准管（mL）	测定管（mL）
沉淀剂—NaF 混合液	0.5	—	—
乳酸标准应用液	—	0.5	—
上清液	—	—	0.5
4%CuSO ₄	0.1	0.1	0.1
浓硫酸	3	3	3
充分混匀，置沸水浴加热 5min，取出后放入冰水浴冷却 10min			
1.5% 对羟基联苯	0.1	0.1	0.1

上述步骤完成后，摇匀，置 30℃ 水浴 30min（每隔 10min 振摇一次）。取出后放入沸水浴中加热 90s，取出冷却至室温，在波长 560nm 处用 5mm 光径比色皿比色，空白管调零。

4.3.3.2.2 乳酸盐测定仪测定方法：按仪器操作说明书操作。

4.3.3.3 血乳酸含量计算

4.3.3.3.1 自配试剂测定方法：

血乳酸含量（mg/L）= $\frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times 100 \times 10$

4.3.3.3.2 乳酸盐测定仪测定方法：直接从乳酸仪上读数，实际值=测得值×3（20μL 样品加入 40μL 破膜液中，已稀释了 3 倍）。

4.4 数据处理及结果判定

乳酸测定数据为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 *F* 值，*F* 值<*F*_{0.05}，结论：各组均数间差异无显著性；*F* 值≥*F*_{0.05}，*P*≤0.05，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；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。

实验结果判定：以三个时间点血乳酸曲线下面积来判断。任一试验组的面积小于对照组，且差异有显著性，可判定该实验结果阳性。

血乳酸曲线下面积计算方法：

血乳酸曲线下面积=1/2×（游泳前血乳酸值+游泳后 0min 的血乳酸值）×10+1/2×（游泳后 0min 的血乳酸值+游泳后休息 20min 的血乳酸值）×20

=5×（游泳前血乳酸值+3×游泳后 0min 的血乳酸值+2×游泳后休息 20min 的血乳酸值）。

5 结果判定

负重游泳实验结果阳性，且血乳酸、血清尿素、肝糖原/肌糖原三项生化指标中任二项指标阳性，可判定该受试样品具有缓解体力疲劳的作用。

八、耐缺氧检验方法

1 常压耐缺氧实验

1.1 原理

缺氧对机体是一种紧张性刺激，影响机体各种代谢，特别是影响机体的氧化供能，最终会导致机体的心、脑等主要器官缺氧供能不足而死亡。

1.2 材料

250mL 磨口瓶、秒表、凡士林、钠石灰（或等量氢氧化钠和碳酸钙）。

1.3 实验动物

推荐用近交系成年小鼠，单一性别，18—22g，每组 10—15 只。

1.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.5 实验步骤

各剂量组经口连续给予不同浓度受试样品，对照组给予同等容量溶剂，于末次灌胃后 1 小时，将各组小鼠分别放入盛有 5g 钠石灰的 250mL 磨口瓶内（每瓶 1 只），用凡士林封瓶口，盖严，使之不漏气，立即计时，以呼吸停止为指标，观察小鼠因缺氧而死亡的时间。

1.6 统计方法及结果判定

缺氧时间为计量数据，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组与对照组比较，存活时间延长，并具有统计学意义，则判定该实验结果阳性。

1.7 注意事项：

1.7.1 每个磨口瓶内最好只放 1 只小鼠，以防互相干扰影响耐缺氧能力的测定。

1.7.2 磨口瓶一定要密闭封严，以防漏气，否则会影响实验结果。

1.7.3 磨口瓶必须等容量（误差 $\pm 1\text{mL}$ ），实验前先用水加以校正。

1.7.4 每批实验动物的体重应尽量保持一致。

2 亚硝酸钠中毒存活实验

2.1 原理

亚硝酸钠使正常二价铁血红蛋白转变为三价铁血红蛋白，破坏血红蛋白携氧能力，造成组织缺氧死亡。

2.2 材料

亚硝酸钠、秒表、1mL 注射器

2.3 实验动物

推荐用近交系成年小鼠，单一性别，18—20g，每组 10—15 只。

2.4 剂量分组

同 1.4

2.5 实验步骤

各剂量组经口连续给予不同浓度受试样品，对照组给予同等容量溶剂，于末次灌胃后 1 小时，各组动物按 200—240mg/kg BW 剂量腹腔注射亚硝酸钠（注射量为 0.1mL/10g），立即计时，记录动物存活时间。

2.6 统计方法及结果判定

存活时间为计量数据，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组与对照组比较，存活时间延长，并具有统计学意义，则判定该实验结果阳性。

3 急性脑缺血性缺氧实验

3.1 原理

动物断头后，由于脑供血终止，在短时间内脑中原有的血液和营养物质尚能使脑功能维持短暂时间，显示出有规律地张口喘气，以喘气时间为指标，可观察受试样品对脑缺血性缺氧的保护作用，凡能使脑耗氧降低的受试样品，均能延长动物喘气时间。

3.2 材料

剪刀、秒表

3.3 实验动物

同 1.3

3.4 剂量分组

同 1.4

3.5 实验步骤

各剂量组经口连续给予不同浓度受试样品，对照组给予同等容量溶剂，于末次灌胃后 1 小时，各组动物自颈部逐只断头，立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间。

3.6 统计方法及结果判定

喘气停止时间为计量数据，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组与对照组比较，喘气时间延长，并具有统计学意义，则判定该实验结果阳性。

3.7 结果判定

常压耐缺氧实验、亚硝酸钠中毒存活实验、急性脑缺血性缺氧实验三项实验中任二项实验结果阳性，可判定该受试样品具有耐缺氧的作用。

3.8 注意事项

3.8.1 断头用的大剪刀必须锋利，断头时操作要敏捷，捉拿小鼠不宜反复多次或捉拿时间过长。

3.8.2 断头部位在小鼠耳根后部，切勿损伤延脑，否则断头后小鼠不显现喘气活动。

九、有助于控制体内脂肪检验方法

1 动物实验

1.1 原理

本方法是以高热量食物诱发动物肥胖，再给予受试样品（肥胖模型），或在给予高热量食物同时给予受试样品（预防肥胖模型），观察动物体重、体内脂肪含量的变化。

1.2 仪器及试剂

动物天平，解剖器械等，戊巴比妥钠。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物

选用雄性大鼠，适应期结束时，体重 $200 \pm 20\text{g}$ ，每组 8—12 只。

1.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个模型对照组，以人体推荐量的 5 倍为其中的一个剂量组，另设两个剂量组，必要时设阳性对照组和空白对照组。受试样品给予时间至少给予 6 周，不超过 10 周。

1.3.3 高热量模型饲料

在维持饲料中添加 15.0%蔗糖、15.0%猪油、适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等。除了粗脂肪外，模型饲料的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、钙：磷均要达到维持饲料的国家标准。

1.3.4 实验步骤

1.3.4.1 肥胖模型法

1.3.4.1.1 适应期：于屏障系统下大鼠喂饲维持饲料观察 5—7 天。

1.3.4.1.2 造模期：

适应期结束后按体重随机分成 2 组，10 只大鼠给予维持饲料作为空白对照组，60 只大鼠给予高热量模型饲料。每周记录给食量、撒食量、剩食量，称量体重 1 次。

喂养 2 周后，给予高热量饲料的 60 只大鼠按体重增重排序，淘汰体重增重较低的 1/3 肥胖抵抗大鼠。将筛选出的 40 只肥胖敏感大鼠再给予高热量饲料 6 周，空白对照组同时给予维持饲料。

1.3.4.1.3 受试样品给予：

造模期结束后，40 只肥胖敏感大鼠按体重随机分成 4 组，分别为模型对照组和三个剂量组。每周记录给食量、撒食量、剩食量，称量体重 1 次。模型对照组和三个剂量组给予高热量模型饲料，空白对照组给予维持饲料。各剂量组灌胃给予不同剂量的受试样品，模型对照组和空白对照组给予等量的相应溶剂，受试样品给予时间 6 周，不超过 10 周。

试验结束后，称体重，1%戊巴比妥钠（0.5mL/100g BW）麻醉，解剖取肾周围脂肪、睾丸周围脂肪，并称重，计算脂/体比。

1.3.4.2 预防肥胖模型法

1.3.4.2.1 适应期：于屏障系统下大鼠喂饲维持饲料观察 5—7 天。

1.3.4.2.2 造模筛选期：

适应期结束后按体重随机分成 2 组，10 只大鼠给予维持饲料作为空白对照组，60 只给予高热量饲料作为模型组。每周记录给食量、撒食量、剩食量，称量体重 1 次。喂养 2 周后，给予高热量饲料的大鼠按体重

增重排序，淘汰体重增重较低的 1/3 肥胖抵抗大鼠。

1.3.4.2.3 受试样品给予：

将筛选出的 40 只肥胖敏感大鼠按体重随机分成 4 组，分别为模型组和三个剂量组。模型对照组和三个剂量组给予高热量模型饲料，空白对照组给予维持饲料。各剂量组灌胃给予不同剂量的受试样品，模型对照组和空白对照组给予等量的相应溶剂，受试样品给予时间 6 周，不超过 10 周。每周记录给食量、撒食量、剩食量，称量体重 1 次。

试验结束后，称体重，1%戊巴比妥钠（0.5mL/100g BW）麻醉，解剖取肾周围脂肪、睾丸周围脂肪，并称重，计算脂/体比。

1.3.5 观察指标

体重、体重增重、摄食量、摄入总热量（摄食量×每公斤饲料热量）、食物利用率、体内脂肪含量（睾丸及肾周围脂肪垫）、脂肪/体重。

1.4 数据处理和结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。采用方差分析加 q 检验进行统计。

实验组的体重或体重增重低于模型对照组，体内脂肪含量或脂/体比低于模型对照组，差异有显著性，摄食量不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于控制体内脂肪动物实验结果阳性。

2 人体试食试验

2.1 原理

单纯性肥胖受试者食用受试样品，观察体重、体内脂肪含量的变化及对机体健康有无损害。

2.2 仪器

体成分测定设备、功率自行车、心率监测器、B 超、皮卡钳、体重计。

2.3 试验方法

2.3.1 受试者纳入标准

受试对象为单纯性肥胖人群，成人 BMI ≥ 30 ，或总脂肪百分率达到男 $> 25\%$ ，女 $> 30\%$ 的自愿受试者。

2.3.2 受试者排除标准

2.3.2.1 合并有心、肝、肾和造血系统等严重疾病，精神病患者。

2.3.2.2 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。

2.3.2.3 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。

2.3.3 试验设计及分组要求

2.3.3.1 不替代主食的有助于控制体内脂肪试验

采用自身对照及组间对照试验设计。按受试者的体重、体内脂肪含量随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、饮食、运动状况等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.3.3.2 替代主食的有助于控制体内脂肪试验

替代主食的有助于控制体内脂肪试验只设单一试食组，有效例数不少于 50 人，采用自身对照，不另设对照组。

2.3.4 受试样品的剂量和使用方法

不替代主食的有助于控制体内脂肪受试样品：试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。按盲法进行试食试验。受试样品给予时间至少 60 天。

替代主食的有助于控制体内脂肪受试样品：建议取代每天 1—2 餐主食，并能保证消费者同时摄取充足的营养素，应鼓励增加果蔬摄入量。受试者按推荐方法和推荐剂量服用受试样品，受试样品给予时间至少 35 天。

2.3.5 观察指标

2.3.5.1 安全性指标

2.3.5.1.1 一般状况（包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等）

2.3.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.3.5.1.3 肝、肾功能检查

2.3.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（各项指标于试验前检查一次）

2.3.5.1.5 血尿酸、尿酮体

2.3.5.1.6 运动耐力测试：运动耐力测试方法为功率自行车试验。

试食前后受试者以相同的运动方案做功率自行车试验，记录心率，并应用 Astrand 和 Ryhming 的列线图间接测定每个受试者的最大摄氧量（L/分）。

2.3.5.1.7 其它不良反应观察：如厌食、腹泻等

2.3.5.2 膳食因素及运动情况观察

不替代主食的有助于控制体内脂肪试验需对受试者试验开始前、结束前进行三天的询问法膳食调查，为排除饮食因素对试验结果的影响，要求尽可能与日常饮食相一致。对试验期间受试者的运动状况进行询问观察，要求与日常运动情况一致。

替代主食的有助于控制体内脂肪试验，除开展不替代主食的设计指标外，还应设立身体活动、情绪、工作能力等测量表格，排除服用受试样品后无相应的负面影响产生。结合替代主食的受试样品配方，对每日膳食进行营养学评估。

每日能量摄入量男性、女性分别不低于 1200kcal、1000kcal，每日主要营养素摄入量要达到人体膳食营养素参考摄入量（DRIs），蛋白质（男：75g，女：65g），钙（800mg），磷（700mg），钾（2000mg），钠（2200mg），镁（350mg），铁（男：15mg，女 20mg），维生素 A（男：800μg，女：700μg）维生素 D（5μg）。

2.3.5.3 功效性指标

2.3.5.3.1 体重，身高，腰围（脐周）、臀围，并计算体质指数（BMI），标准体重、超重度。

$$\text{成年人 (BMI)} = \frac{\text{体重 (kg)}}{\text{身高}^2 (\text{m}^2)}$$

$$\text{超重度 (\%)} = \frac{\text{实测体重} - \text{标准体重}}{\text{标准体重}} \times 100\%$$

2.3.5.3.2 体内脂肪含量的测定

体内脂肪总量和脂肪占体重百分率，用水下称重法或电阻抗法。

皮下脂肪厚度用 B 超测定法或皮卡钳法，4 个测定位点见下表

A 点	右三角肌下缘臂外侧正中点
B 点	右肩胛下角
C 点	右脐旁 3cm
D 点	右髂前上棘

2.4 数据处理和结果判定

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

3 结果判定

不替代主食的有助于控制体内脂肪受试样品：试食组自身比较及试食后试食组与对照组比较，其体内脂肪含量减少，皮下脂肪四个点中至少有两个点减少，腰围与臀围之一减少，且差异有显著性（ $P<0.05$ ），运动耐力不下降，对机体健康无不良影响，并排除膳食及运动对有助于控制体内脂肪作用的影响，可判定该受试样品具有有助于控制体内脂肪作用。

替代主食的有助于控制体内脂肪受试样品：试食组试验前后自身比较，其体内脂肪含量减少，皮下脂肪四个点中至少有两个点减少，腰围与臀围之一减少，且差异有显著性（ $P<0.05$ ），能量和营养学评价无异常，运动耐力不下降，情绪、工作能力不受影响，并排除运动对有助于控制体内脂肪作用的影响，可判定该受试样品具有有助于控制体内脂肪作用。

十、有助于改善骨密度检验方法

有助于改善骨密度作用检验方法根据受试样品作用原理的不同，分为方案一（补钙为主的受试物）和方案二（不含钙或不以补钙为主的受试物）两种。

1 方案一

1.1 实验原理

机体中的钙绝大部分储存于骨骼及牙齿中，大鼠若摄入钙量不足会影响机体和骨骼的生长发育，表现为体重，身长，骨长，骨重，骨钙含量及骨密度低于摄食足量钙的正常大鼠。生长期大鼠在摄食低钙饲料的基础上分别补充碳酸钙（对照组）或受试含钙产品（实验组），比较两者在促进机体及骨骼的生长发育，增加骨矿物质含量和增加骨密度功能上的作用，从而对受试样品有助于改善骨密度的功能进行评价。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器：原子吸收分光光度计、骨密度仪（双能 X 线骨密度仪、或单光子骨密度仪或相关仪器）、精密卡尺、动物解剖器械、动物天平、105℃烘箱。

1.2.2 硝酸，优级纯

高氯酸，优级纯

氧化镧，2%氧化镧溶液 称取分析纯氧化镧（含量大于 99.99%）25 克，加 75mL 优级纯盐酸，加去离子水至 1000mL。

钙标准溶液 称取 1.2486 克分析纯碳酸钙（纯度大于 99.99%），加 50mL 去离子水，加盐酸使之溶解。移入 1000mL 容量瓶中，加 2%氧化镧溶液至刻度。此溶液 1.00mL 相当于 500μg 钙。储于聚乙烯瓶中，4℃保存，临用时稀释。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物

出生 4 周左右的断乳大鼠，体重约 60—75 克，同一性别，每组 8—12 只。

1.3.2 基础饲料：用此基础饲料配制低钙对照组以及各剂量组。

表 1 基础饲料配方（Ca²⁺计，调整 Ca²⁺为 150mg/100g 饲料）

成分	%
酪蛋白	10.0
黄豆粉 ^①	15.0
小麦面粉	54.0
玉米油或花生油	4.0
纤维素	2.0
混合盐 ^②	2.6
混合维生素 ^③	1.0
氯化胆碱	0.2
DL-蛋氨酸	0.2
淀粉 ^④	11.0

①需高压处理后用

②混合盐：每 kg 混合盐中各组份含量：KH₂PO₄，501.4g；NaCl，74.0g；MgCO₃，50.2g；乳酸亚铁，5.4g；

乳酸锌, 4.16g; MnCO_3 , 3.5g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.605g; Na_2SeO_3 , 6.6mg; KI, 7.76mg; $\text{Cr}_3\text{Cl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.292g; 加蔗糖到 1kg。

③混合维生素: 每 kg 混合维生素中各组份含量: 维生素 A, 400,000IU; 维生素 D_3 , 100,000IU; 维生素 E, 500IU; 维生素 K, 5mg; 维生素 B_1 , 600mg; 维生素 B_2 , 600mg; 维生素 B_6 , 700mg; 维生素 B_{12} , 1mg; 尼克酸, 3g; 叶酸, 200mg; 泛酸钙, 1.6g; 生物素, 20mg; 加蔗糖到 1kg。

④可根据各组待测受试物(或碳酸钙)的需用量调节淀粉用量。

1.3.3 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组, 以人体推荐量的 5 倍为其中的一个剂量组, 另设二个剂量组, 同时设一个低钙对照组(150mg/100g 饲料)和与相应剂量受试物钙水平相同的碳酸钙对照组(如仅设一个碳酸钙对照组, 推荐设立与高剂量钙水平相同的碳酸钙对照组)。用低钙对照组(150mg/100g 饲料)饲料配制受试样品各剂量组和碳酸钙对照组。受试样品给予时间 3 个月。

1.3.4 受试物给予途径

经口灌胃给予受试物, 无法灌胃时将受试物掺入饲料, 并记录每只动物的饲料摄入量。

1.3.5 实验步骤

出生 4 周的断乳大鼠经适应期一周后, 禁食 12 小时, 称体重, 按体重随机分组, 分笼饲养。饮用去离子水以避免从饮水中获得钙。

1.4 观察指标

1.4.1 体重测定:

禁食 12 小时后, 测定体重。每周一次。

1.4.2 股骨重量测定:

动物喂养 3 个月后处死, 剥离出右侧股骨, 于 105℃烤箱中烤至恒重, 称量骨干重。

1.4.3 股骨骨密度测定:

用骨密度仪, (双能 X 线骨密度仪、或单光子骨密度仪或相关仪器) 测量股骨中点及股骨远心端的骨密度。

1.4.3.1 在股骨远心端及股骨中点画出标记以确定测量点。

股骨中点测量点的确定: 测量股骨全长, 通过其中点, 沿横截面方向画一直线, 此为股骨中点测量点(截面)。

股骨远心端测量点的确定: 于股骨远心端关节凹槽最下缘处确定测量点, 通过此点, 画一与上述股骨中点处标记平行的直线, 此为股骨远心端测量点(截面)。

1.4.3.2 测量前用骨模型对仪器进行校准。

1.4.3.3 经校准可以使用后, 继续测定骨模型并与其标准值进行比较, 误差不得超过 3%。

1.4.3.4 双能 X 线骨密度仪或单光子骨密度仪参数设定:

测定方式: 精密

扫描次数: 2 次

扫描方式: 自动

探测域值: 99%

1.4.3.5 测量股骨中点及股骨远心端骨密度。

将待测骨放置于测量台上与骨密度仪探测头移动方向垂直; 移动待测骨, 令其待测点标记线与探测头移动轨迹于测量台上的垂直投影重合。开始测量, 每点应重复测定两次, 如两次结果不平行(误差大于 10%), 应当重新测量。将两次结果取平均值, 以 BW(骨宽)除 BMC(骨矿物质含量), 其结果即为 BMD(骨密度)。

1.4.4 骨钙含量及饲料含钙量测定:

用原子吸收法测量。

1.4.4.1 样品采集与制备

1.4.4.1.1 饲料样品经均匀混合并过 20 目筛，在烘箱中烘干，置干燥器中冷却后称重，磨细。注意防止在样品制备过程中的污染。

1.4.4.1.2 取大鼠一侧股骨在 105℃烘箱中烘干至恒重后，置于三角瓶中进行消化。

1.4.4.2 样品消化

根据样品中钙的含量，准确称取 0.300~1.00 克，置于 150mL 三角瓶中，上盖小漏斗，加入混合酸（硝酸：高氯酸=4：1）15~20mL，在电热板上加热消化直至冒白烟并透明无色。酸液不够时可以再加入少量混合酸。消化液透明无色后加数毫升去离子水，煮沸以赶除剩余的酸，重复两次，最后消化液的体积不超过 1mL。

消化样品时应同时作空白试验，加入与样品消化时相同体积的混合酸，在相同条件下消化。

1.4.4.3 测定

按照原子吸收分光光度计仪器说明书的步骤进行。测定液、标准溶液和空白均用 0.5%氧化铜溶液稀释，定容。

1.5 数据处理及结果判定

实验数据采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

骨钙含量或骨密度显著高于低钙对照组且不低于相应剂量碳酸钙对照组，钙的吸收率不低于碳酸钙对照组，可判定受试物具有有助于改善骨密度的作用。

2 方案二

2.1 实验原理

雌性成年大鼠切除卵巢后，骨代谢增强，并发生骨重吸收（破骨）作用大于骨生成（成骨）作用的变化。这种变化表现为骨量丢失，经过一定时间的积累，可以造成骨密度降低模型。在建立模型的同时或模型建立之后给模型实验组大鼠补充受试样品，通过受试物抑制破骨或促进成骨等骨代谢调节作用，观察其在增加骨密度功能及骨钙含量的效果，从而对受试样品有助于改善骨密度的功能进行评价。

2.2 实验动物

Wistar 或 SD 雌性大鼠，300 克左右，实验前适应 1 周。

2.3 饲料配方

参照 AIN93 饲料配方配制半成品饲料，用适当的物质替换饲料中来源于大豆的成分，以避免大豆异黄酮等植物雌激素对实验结果的干扰。参考配方见下表。

表 2 参考饲料配方

成分	含量 (%)
酪蛋白	23
DL-蛋氨酸	0.3
玉米淀粉	32

蔗糖	30
纤维	5
玉米油	5
混合矿物盐 1	3.5
混合维生素 2	1
二酒石酸胆碱	0.2

1 含有 (mg/kg 饲料): MnSO_4 110, CuSO_4 0.8, FeSO_4 1.2, KI 18.0, ZnSO_4 2, 960, CaHPO_4 2, 890, MgSO_4 1.25×10^4 。

2 含有 (/kg 饲料): VitA 1.4×10^4 IU, VitD 1, 500 IU, VitE 120mg, VitK 3mg, VitB₁ 12mg, VitB₂ 20mg, VitB₆ 12mg, VitB₁₂ 0.03mg, 烟酸 60mg, 泛酸 24mg, 叶酸 6mg, 生物素 0.54mg。

2.4 仪器和试剂

2.4.1 仪器: 原子吸收分光光度计、双能 X 线骨密度仪、单光子骨密度仪、精密卡尺、动物解剖器械、动物天平、105℃烘箱。

2.4.2 试剂

硝酸, 优级纯

高氯酸, 优级纯

氧化镧, 2%氧化镧溶液 称取分析纯氧化镧 (含量大于 99.99%) 25g, 加 75mL 优级纯盐酸, 加去离子水至 1000mL。

钙标准溶液 称取 1.2486g 分析纯碳酸钙 (纯度大于 99.99%), 加 50mL 去离子水, 加盐酸使之溶解。移入 1000mL 容量瓶中, 加 2%氧化镧溶液至刻度。此溶液 1.00mL 相当于 500μg 钙。储于聚乙烯瓶中, 4℃保存, 临时时稀释。

2.5 实验设计和实验剂量

2.5.1 卵巢切除术及术后筛查

大鼠经腹腔注射 30 mg/kg BW 的戊巴比妥钠溶液麻醉, 腹位固定后于腹中线距阴道口 3—4cm 处去毛, 分别用碘酒和酒精消毒, 待稍干后切开皮肤和腹肌约 2—3cm, 切口视野可见白色脂肪, 拨开脂肪层找到子宫后, 轻轻将一侧子宫角拉出, 在其末端可见被脂肪团包裹的卵巢。分离脂肪团, 便可见到粉红色或黄红色的卵巢, 以止血钳夹住卵巢, 然后将卵巢下输卵管 (包括脂肪) 用丝线结扎, 剪除卵巢 (检查是否完全剪除), 顺势将子宫角送回腹腔中, 同法剪除另侧卵巢。腹肌和皮肤分层缝合后, 再次消毒。最后经后肢肌肉注射 2 万 U 青霉素。也可经背部肋骨角切口行卵巢切除术。为保证手术成功, 大鼠摘除卵巢后 5 天, 进行阴道涂片检查 (用滴管吸取少量生理盐水, 轻轻插入阴道 1—2cm, 冲洗数次后吸出, 涂于玻片上, 镜下观察), 每天一次, 连续 7 天, 以检查大鼠卵巢是否完全摘除; 如涂片呈动情反应 (镜下见大量半透明、扁平的表皮细胞), 表明动物卵巢切除不完全, 应弃去不用。有经验者可不进行术后筛查。

2.5.2 动物分组

大鼠经适应性饲养后分组, 实验动物按体重随机分组为假手术组、切除卵巢组+溶剂组、切除卵巢+低剂量受试物组、切除卵巢+中剂量受试物组、切除卵巢+高剂量受试物组。必要时设切除卵巢+阳性对照组 (具雌激素活性的物质)。每组动物 8—12 只。

2.5.3 剂量分组及受试样品给予时间

如果受试物为不含钙产品, 实验设三个剂量组和一个阴性对照组, 以人体推荐量的 5 倍为其中的一个剂量组, 另设二个剂量组, 必要时设阳性对照组。如果受试物是不以补钙为主 (可少量含钙) 的产品, 在根据成人每公斤人体推荐量设置三个剂量受试物组的基础上, 可再设与相应受试物钙水平相似的碳酸钙对照组。

（如仅设一个碳酸钙对照组，推荐设立与高剂量钙相同的碳酸钙对照组。）各组动物手术后 3—5 天开始灌胃给予受试物或溶剂，无法灌胃时将受试物掺入饲料，并记录每只动物的饲料摄入量。要考虑饲料中是否存在大豆异黄酮对结果的影响。受试物给予时间 3 个月。

2.6 观察指标

2.6.1 体重

2.6.2 骨钙测定

2.6.2.1 样品采集与制备

取大鼠一侧股骨在 105℃烘箱中烘干至恒重后，称量骨干重，置于三角瓶中进行消化。

2.6.2.2 样品消化

根据样品中钙的含量，准确称取 0.300~1.00g，置于 150mL 三角瓶中，上盖小漏斗，加入混合酸（硝酸：高氯酸=4：1）15~20mL，在电热板上加热消化直至冒白烟并透明无色。酸液不够时可以再加入少量混合酸。消化液透明无色后加数毫升去离子水，煮沸以赶除剩余的酸，重复两次，最后消化液的体积不超过 1mL。

消化样品时应同时作空白试验，加入与样品消化时相同体积的混合酸，在相同条件下消化。

2.6.2.3 测定

原子吸收法或化学法测定骨钙含量。

2.6.3 骨密度测定：用骨密度仪测定股骨中点和股骨远心端骨密度。

2.6.3.1 在股骨远心端及股骨中点画出标记以确定测量点。

股骨中点测量点的确定：测量股骨全长，通过其中点，沿横截面方向画一直线，此为股骨中点测量点（截面）。

股骨远心端测量点的确定：于股骨远心端关节凹槽最下缘处确定测量点，通过此点，画一与上述股骨中点处标记平行的直线，此为股骨远心端测量点（截面）。

2.6.3.2 测量前用骨模型对仪器进行校准。

2.6.3.3 经校准可以使用后，继续测定骨模型并与其标准值进行比较，误差不得超过 3%。

2.6.3.4 骨密度仪参数设定

测定方式：精密

扫描次数：2 次

扫描方式：自动

探测域值：99%

2.6.3.5 测量股骨中点及股骨远心端骨密度

将待测骨放置于测量台上与骨密度仪探测头移动方向垂直；移动待测骨，令其待测点标记线与探测头移动轨迹于测量台上的垂直投影重合。开始测量，每点应重复测定两次，如两次结果不平行（误差大于 10%），应当重新测量。将两次结果取平均值，以 BW（骨宽）除 BMC（骨矿物质含量），其结果即为 BMD（骨密度）。

2.7 数据处理和结果判定

实验数据采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

不含钙的产品，卵巢切除+溶剂组骨钙含量或骨密度显著低于假手术组，表明造成大鼠骨密度低下模型；

卵巢切除+受试物组的骨钙含量或骨密度较卵巢切除+溶剂组显著增加，而其它指标（体重除外）不显著低于卵巢切除+溶剂组，可判定受试物具有有助于改善骨密度作用。

不以补钙为主（可含少量钙）的产品，卵巢切除+溶剂组骨钙含量或骨密度显著低于假手术组，表明造成大鼠骨密度低下模型；卵巢切除+受试物组的骨钙含量或骨密度较卵巢切除+溶剂组显著增加，且不低于相应剂量的 CaCO_3 对照组，而其它指标（体重除外）不显著低于卵巢切除+溶剂组，可判定受试物具有有助于改善骨密度作用。

附录：钙吸收实验

1 原理

在稳定状态下测定大鼠摄入的钙量及粪便中排出的钙量，两者的差值即为表观吸收的钙。

钙的表观吸收率(%) = (摄入钙-粪钙) / 摄入钙 × 100%

由于钙的吸收率受鼠龄、性别、饲料成分及钙摄入水平的影响较大，应在其他影响因素尽可能相同条件下，将受试样品与碳酸钙的吸收率进行比较，对受试样品钙的吸收率进行评价。

2 仪器及试剂

2.1 代谢鼠笼

2.2 动物天平

2.3 原子吸收分光光度计：具火焰法测定装置氘灯背景扣除

2.4 硝酸：优级纯

2.5 高氯酸：优级纯

2.6 2%氧化镧溶液：称取分析纯氧化镧（含量>99.99%）25g，加 75mL 优级纯盐酸，加去离子水至 1000mL。

2.7 钙标准溶液：称取 1.2486g 分析纯碳酸钙（纯度大于 99.99%），加 50 mL 去离子水，加盐酸使之溶解。移入 1000 mL 容量瓶中，加 2%氧化镧溶液至刻度。此溶液 1.00mL 相当于 500μg 钙。储于聚乙烯瓶中，4℃ 保存，临用时稀释。

3 实验方法

3.1 实验动物：出生 4 周左右的断乳大鼠

3.2 基础饲料：低钙饲料配方见表 1

4 动物分组及剂量设置

实验设三个剂量组，以人体推荐量的 5 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，同时设一个低钙对照组（150mg/100g 饲料）和与相应剂量受试物钙水平相同的碳酸钙对照组（如仅设一个碳酸钙对照组，推荐设立与高剂量钙水平相同的碳酸钙对照组）。用低钙对照组（150mg/100g 饲料）饲料配制受试样品各剂量组和碳酸钙对照组。

4.1 生长发育

出生四周的断乳大鼠经适应期 1 周后，分笼饲养 4 周。每组至少有同一性别动物 8 只。饮用去离子水以避免从饮水中获得钙。每周测量身长、体重一次。

4.2 代谢实验

实验 3 周后进行 3 天钙代谢实验。记录 3 天进食量，收集 72 小时粪便，测定饲料及粪便中钙含量。

4.3 饲料及粪便中钙的测定方法：用原子吸收分光光度法进行测定

4.3.1 样品采集与制备：饲料样品经均匀混合并过 20 目筛；鼠粪样品在 80℃烘箱中烘干，置干燥器中冷却后磨细。注意防止在样品制备过程中的污染。

4.3.2 样品消化：根据样品中钙的含量，精确称取烘干磨细的均匀样品 0.30—1.00g，置于 150mL 三角瓶中，上盖小漏斗。加入混合酸（硝酸:高氯酸=4:1）15—20mL，在电热板上加热消化直至消化液冒白烟并透明无色。酸液不够时可以再加少量混合酸。消化液透明无色后加数毫升去离子水，煮沸以赶除剩余的酸，重复两次，最后消化液的体积不超过 1mL。消化样品时应同时作空白实验，加入与受试样品消化时相同体积的混合酸，在相同条件下消化。消化液转移至容量瓶并用去离子水定容。

4.3.3 测定：按照原子吸收分光光度计仪器说明书的步骤进行。测定液、标准溶液和空白均用氧化镧溶液稀释。

4.4 计算

摄入钙（mg/d）=饲料中钙含量（mg/g）×饲料消费量（g/d）

粪钙（mg/d）=粪便中钙含量（mg/g）×粪便排出量（g/d）

4.5 饲料及鼠粪中钙的测定也可用滴定法进行（详见 GB 12398.90）。

5 数据处理及结果判定

数据采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组动物喂养 4 周时的身长、体重如显著低于相同钙摄入水平的对照组动物，或受试样品所含钙的吸收率显著低于相同钙摄入水平碳酸钙的吸收率则应判定为不能作为补钙产品。

受试样品钙的吸收率如与相同钙摄入水平的碳酸钙相近而无显著性差异，受试样品可以作为补钙剂。

受试样品钙的吸收率若在两种钙摄入水平上均显著高于相同水平碳酸钙，则可以判定受试样品为“钙吸收率较高”。

十一、改善缺铁性贫血检验方法

1 动物实验

1.1 原理

用低铁饲料喂饲动物可形成实验性缺铁性贫血模型，再给予受试样品，观察其对血液细胞学、血液生化学等指标的影响，可判定该受试样品对改善动物缺铁性贫血的作用。

1.2 实验动物

健康初断乳大鼠，单一性别，每组大鼠 8—12 只。

1.3 低铁饲料

配方：

成 分	添加量 g/kg
玉米淀粉	529.5
蛋清蛋白*	200.0
蔗糖	100.0
玉米油（无添加剂）	70.0
纤维素	50.0
混合矿物盐(AIN-93G-MX)	35.0
混合维生素(AIN-93G-VX)	10.0
L-胱氨酸	3.0
氯化胆碱	2.5

* 亦可使用 EDTA 处理的酪蛋白

AIN-93G 混合矿物盐配方

矿物质	添加量 g or mg/kg mix
Calcium carbonate anhydrous	357.00
Potassium phosphate monobasic	196.00
Potassium citrate, tripotassium monohydrate	70.78
Sodium chloride	74.00
Potassium sulfate	46.60
Magnesium oxide	24.00
Zinc carbonate	1.65
Sodium meta-silicate $9H_2O$	1.45
Manganous carbonate	0.63
Cupric carbonate	0.30
Chromium potassium sulfater $12H_2O$	0.275
Boric acid (17.5% B), mg	81.50
Sodium fluoride (45.24% F), mg	63.50

Nickel carbonate (45% Ni), mg	31.80
Lithium chloride (16.38% Li), mg	17.40
Sodium selenate anhydrous(41.79% Se), mg	10.25

AIN-93G 混合维生素配方

维生素	添加量 g/kg mix
Nicotinic acid	3.000
Ca pantothenate	1.600
Pyridoxine-HCl	0.700
Thiamin-HCl	0.600
Riboflavin	0.600
Folic acid	0.200
Biotin	0.020
Vitamin B-12 (cyanocobalamin) (0.1% in mannitol)	2.500
Vitamin E (all-rac- α -tocopheryl acetate)2 (500 IU/g)	15.000
Vitamin A (all-trans-retinyl palmitate)2 (500,000 IU/g)	0.800
Vitamin D-3 (cholecalciferol) (400,000 IU/g)	0.250
Vitamin K-1 (phylloquinone)	0.075
Powdered sucrose	974.655

1.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个低铁对照组，以人体推荐量的 5 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组（硫酸亚铁或乳酸亚铁，剂量为 2 ppm 或 2 mg/kg BW，以 Fe 元素计）。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.5 实验步骤

1.5.1 建立缺铁性贫血大鼠模型

选用健康断乳大鼠在实验环境下适应 3—5 天后饲予低铁饲料及去离子水（或双蒸水），采用不锈钢笼及食罐，同时，采用剪尾取血法放血，5 天一次，每次 0.3—0.5ml。实验过程中避免铁污染。自第 3 周开始每周选取部分大鼠采尾血测 Hb，如多数动物 Hb 低于 100g/L 时，测定全部大鼠的体重及 Hb。

1.5.2 恢复实验

选取 Hb<100g/L 的大鼠作为实验动物，根据贫血大鼠 Hb 水平和体重将其随机分为低铁对照组和三个实验组，各组均继续饲予低铁饲料，低铁对照组给予相应溶剂，实验组分别给予不同剂量的受试样品，受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天，测定体重及各项血液学指标。

1.6 观察指标

体重、血红蛋白、红细胞压积/红细胞内游离原卟啉。

1.6.1 血红蛋白测定（氰化高铁法）

消光系数法和标准曲线法任选其一测定血红蛋白。在满足实验方案和仪器要求的前提下，也可采用血液分析仪测定。

1.6.1.1 吸光系数法

1.6.1.1.1 原理

血红蛋白（haemoglobin, Hb）被铁氰化钾氧化后生成高铁血红蛋白，再与氰离子结合形成氰化高铁血红蛋白（红色），氰化高铁血红蛋白（红色）极为稳定，在 540nm 波长下，摩尔吸光系数为 44000，据此，用分光光度法测其光密度，运用吸光系数作血红蛋白的定量测定。

1.6.1.1.2 仪器

分光光度计。

10 微升微量吸管。

1.6.1.1.3 试剂

称取碳酸氢钠（NaHCO₃, AR）140mg、铁氰化钾 200mg、氰化钾 50mg，用水溶解并稀释到 1000mL。贮存于棕色试剂瓶内，在暗处或冰箱（4℃）保存，至少可稳定数月 1 年。

1.6.1.1.4 实验步骤

1.6.1.1.4.1 取试剂 2.5mL 于 5mL 带盖试管中，加入 10μL 血液，混匀后，放置 15 分钟。

1.6.1.1.4.2 选用 0.5 厘米光径比色杯，于 540nm 波长下，以试剂调零点，将所得样品管之光密度乘以 736，即为血红蛋白浓度（g/L）。

计算公式如下：

$$C_t = \frac{D_{HiCN}^{540} \times 251}{44000 \times 0.5} \times 64458 = D_{HiCN}^{540} \times 736$$

C_t=待测的血红蛋白（g/L）浓度。

D_{HiCN}⁵⁴⁰ = 氰化高铁血红蛋白在 540nm 波长下测出的光密度。

251 = 测定时血液的稀释倍数（血 10μL 加入试剂 2.5mL 中）

44000 = 氰化高铁血红蛋白的摩尔吸光系数

0.5 = 比色杯的光径

64458 = 血红蛋白的分子量

1.6.1.1.5 注意事项

1.6.1.1.5.1 试剂不要放在聚乙烯瓶内，以免因氰离子与其反应而使试剂作用降低。

1.6.1.1.5.2 仪器因摩尔吸光系数法完全依靠仪器的吸光度来计算，故此法要求所用的仪器性能要符合要求（如仪器的波长准确与否，以及灵敏度及线性等），否则将直接影响测定的结果。

1.6.1.1.5.3 仪器在使用前最好应以 WHO 规定的氰化高铁血红蛋白参考液校正后再使用。参考液最好选用 ICSH（国际血液学标准化委员会）确定的由 RIV（荷兰国立公共卫生研究院）制作的氰化高铁血红蛋白参考液或上海医学化验所制备的氰化高铁血红蛋白标准液。

1.6.1.2 标准曲线法

1.6.1.2.1 原理

血红蛋白（hemoglobin, Hb）在铁氰化钾和氰化钾的作用下生成极为稳定的氰化高铁血红蛋白（红色），其颜色深浅与血红蛋白的含量成正比。用分光光度计在 540nm 波长下，测定血红蛋白标准品和参考标准物质的吸光度，制成标准曲线，测得待测样品的吸光度后查标准曲线即可得 Hb 的浓度。

1.6.1.2.2 仪器

10μL 血色素吸管（或定量毛细管）

5mL 或 10mL 带盖试管

分光光度计

1.6.1.2.3 试剂

称取碳酸氢钠 (NaHCO_3 , AR) 140mg、铁氰化钾 200mg、氰化钾 50mg, 用蒸馏水溶解并稀释到 1000mL, 贮存于棕色试剂瓶内, 保存于 4℃ 冰箱可稳定至 1 年。

1.6.1.2.4 实验步骤

吸取 2.5mL 试剂于 5mL 带盖试管中, 用 10 μL 血色素吸管 (或定量毛细管) 取大鼠尾血或静脉血 10 μL 放置于已放入试剂的试管中; 混匀放置 15min。选用 0.5cm 光径比色杯, 于 540nm 波长下, 以试剂调节仪器零点, 测定各样品管的吸光度, 同时测定血红蛋白标准和参考标准物质的吸光度, 绘制血红蛋白的标准曲线。查标准曲线可求得待测样品和参考标准物质的血红蛋白含量 (g/L), 计算参考物质的回收率。

1.6.1.2.5 注意事项

1.6.1.2.5.1 不要将试剂放在聚乙烯瓶内, 以免因氰离子与其反应而使试剂作用降低。

1.6.1.2.5.2 不宜直接使用消光系数方法计算血红蛋白的含量, 因为仪器的波长准确与否、仪器的灵敏度和线性等因素均直接影响测定结果。

1.6.1.2.5.3 每次测定时, 在不同间隔反复测定血红蛋白标准液和参考标准物质 (低、中、高 3 个浓度)。

1.6.1.3 数据处理及结果判定

实验数据可用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

结果判定

受试样品组与对照组比较, 血红蛋白浓度升高经统计处理差异有显著性, 且受试样品组前后升高幅度平均达到 10g/L 以上, 判定该实验结果阳性。

1.6.2 红细胞内游离原卟啉测定

1.6.2.1 原理

血红蛋白的合成过程中, 幼红细胞中的原卟啉在血红素合成酶的作用下与铁结合, 当铁供应不足时, 红细胞内的原卟啉乃以游离形式累积起来超过正常水平。因此, 检测红细胞内游离原卟啉 (Free erythrocyte protoporphyrin, FEP) 的含量是检查缺铁性红细胞生成的有效方法。

血液样品经生理盐水稀释后, 分别以乙酸乙酯: 乙酸混合液 (4:1) 和 0.5N 盐酸提取分离血中游离原卟啉, 在一定波长下测定其原卟啉的荧光强度而定量。

1.6.2.2 仪器

1.6.2.2.1 荧光分光光度计或 930 型荧光光度计。

1.6.2.2.2 离心机。

1.6.2.2.3 混旋器。

1.6.2.3 试剂

1.6.2.3.1 肝素抗凝剂 一支 12500 单位的肝素以 0.9% 生理盐水稀释至 25mL (1mL=500 单位)。

1.6.2.3.2 5% (W/V) 硅藻土生理盐水悬浊液 称取 5g 硅藻土加 0.9% 生理盐水至 100mL。

1.6.2.3.3 4:1 乙酸乙酯和乙酸混合液。

1.6.2.3.4 0.5N HCl。

1.6.2.3.5 原卟啉标准液。

1.6.2.3.5.1 原卟啉标准贮备液 (50mg/L): 称取 5mg 原卟啉, 加 4mL 无水乙醇使之溶解, 以 1.5N HCl 稀释至 100mL。

1.6.2.3.5.2 原卟啉标准中间液 (1.0mg/L): 取 2mL 原卟啉贮备液, 以乙酸乙酯与乙酸 (4:1) 混合液稀释到 100mL。

1.6.2.3.5.3 原卟啉标准应用液 (0.1mg/L): 取 1mL 原卟啉中间液, 以乙酸乙酯与乙酸 (4:1) 混合液稀释到 10mL。

1.6.2.4 实验步骤

试 剂	样品管	空白管	标准管
肝素 (mL)	0.10	0.10	0.10
全血 (mL)	0.02	—	—
水 (mL)	—	0.02	0.02
5%硅藻土悬浊液 (mL)	0.15	0.15	0.15
原卟啉标准应用液 (mL)	—	—	0.5
乙酸乙酯与乙酸 (4:1) 混合液 (mL)	4	4	3.5

注：按上表依次加入各种试剂，在加入乙酸乙酯与乙酸混合液前，用混旋器混合已加入的混合液，然后边混合边加入乙酸乙酯与乙酸混合液。

离心 15 分钟，将各管上清液分别倒入 10mL 比色管中，每管加 4mL 0.5N 盐酸，振摇 5 分钟静止使之分层，将上层溶剂抽出弃去，测定盐酸液的荧光强度（30 分钟内比色）。

1.6.2.5 荧光测量

1.6.2.5.1 若使用日立 MPF-4 型荧光分光光度计测定条件为激发波长为 403nm, 狭缝 10nm; 发射波长为 605nm, 狭缝为 5nm, 液槽为 1cm 厚石英槽。

1.6.2.5.2 若使用国产 930 型荧光光度计测试，条件为激发滤光片 420，荧光滤片 550，灵敏度 1×500 ，满度开关开至最大，液槽为 1cm 厚石英槽，检出灵敏度为 $0.01\mu\text{g}/4\text{mL}$ 。在不同量原卟啉 ($0\mu\text{g}$, $0.01\mu\text{g}$, $0.03\mu\text{g}$, $0.05\mu\text{g}$, $0.07\mu\text{g}$, $0.1\mu\text{g}$) 呈线性关系。

1.6.2.6 计算

$$\text{血中原卟啉含量}(\mu\text{g/L 全血}) = \frac{\text{样品荧光强度}-\text{空白荧光强度}}{\text{标准管荧光强度}-\text{空白荧光强度}} \times \text{标准管原卟啉含量}(\mu\text{g}) \times \frac{100}{\text{样品取样量}(\text{mL})} \times 10$$

1.6.2.7 数据处理及结果判定

实验数据可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

受试样品组与对照组比较，红细胞内游离原卟啉降低经统计处理差异有显著性，即可判定该实验结果阳性。

1.6.2.8 注意事项

1.6.2.8.1 荧光强度随时间延长而逐渐衰退，但 30 分钟内基本稳定。

1.6.2.8.2 加乙酸乙酯-乙酸混合液时，一定要边混合边加入，否则影响测定结果。

1.6.2.9 滤纸法测定：

将滴有 20 微升血点全部剪下放入试管中，同时取同样大小空白滤纸放入标准管和空白管中，各管均加入 5%硅藻土悬浊液 0.2 毫升，振荡后放置过夜，以下步骤同直接法。

计算： $\text{FEP}(\text{微克}/100 \text{ 毫升全血}) = C/B \times A/D \times 100$

A=标准管原卟啉含量（0.02 毫克）
B=标准管荧光强度-空白管荧光强度
C=血样荧光强度-空白管荧光强度
D=取样量

1.6.3 红细胞压积测定：使用全自动血细胞分析仪进行。数据处理及结果判定同“1.6.2.7”。

1.7 数据处理和结果判定

实验数据可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

受试样品组与低铁对照组相比，若血红蛋白差异有显著性，且其前后平均升高幅度达到 10g/L 以上，同时，受试样品红细胞内游离原卟啉或红细胞压积与低铁对照组相比差异有显著性，可判定该受试样品改善缺铁性贫血动物实验结果阳性。

1.8 注意事项

本项实验关键在于贫血模型的建立。低铁饲料含铁量最好控制在 9mg/kg 以下，所用试剂应为分析纯，动物饮用水应为去离子水或双蒸水，采用不锈钢笼具，所用器皿应用 10%硝酸溶液处理。实验过程中严防外来铁的污染及彼此交叉污染。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

受试者为小细胞低色素贫血，且有明确的缺铁原因和临床表现的成人和儿童。

2.1.1 成人纳入标准：男性 Hb 80g/L—130g/L，女性 Hb 80g/L—120g/L。

2.1.2 儿童纳入标准： ≤ 6 岁儿童 Hb 70g/L—110g/L；7—18 岁青少年 80g/L—120g/L。

2.2 受试者排除标准

2.2.1 合并有心、脑血管、肝、肾、消化道等严重疾病及精神病患者。

2.2.2 过敏体质或对该受试样品过敏者。

2.2.3 严重贫血患者。

2.2.4 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。

2.2.5 未按标准服用受试样品、资料不全影响功效或安全性判断者。

2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的血红蛋白水平随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如性别、年龄、经济状况等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照，也可服用具有同样作用的阳性物。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 120 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正

常饮食。

2.5 观察指标

2.5.1 安全性指标

2.5.1.1 一般状况（包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等）

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查（儿童受试者不测定此项）

2.5.1.4 腹部 B 超、胸片、心电图检查（各项指标在试验前检查一次，儿童受试者不测此项）

2.5.2 膳食调查

于试验开始前、结束前进行三天的询问法膳食调查，观察饮食因素对试验结果的影响。

2.5.3 症状观察

食欲不振、乏力、烦躁、头晕、眼花、精神不集中、心慌、气短等。

2.5.4 功效性指标

儿童观察指标：血红蛋白、红细胞内游离原卟啉

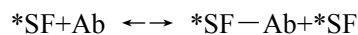
成人观察指标：血红蛋白、血清铁蛋白、血清运铁蛋白饱和度/红细胞内游离原卟啉

2.5.4.1 血红蛋白测定：见 1.6.1。

2.5.4.2 血清铁蛋白测定（放射免疫法）：

2.5.4.2.1 原理

人血清中的铁蛋白（SF）与加入的 ^{125}I 标记的 SF 竞争性地与抗铁蛋白抗体结合。用第二抗体分离结合部分，分别测定总放射性与沉淀物放射性计数。依据标准 SF 试剂作出标准曲线，从而可在曲线上查出相应样品血清的 SF 浓度。



+

SF

↑↓

SF-Ab

+

SF

*SF：标记的铁蛋白

SF：未标记的铁蛋白

Ab：抗铁蛋白抗体

2.5.4.2.2 仪器

离心机、 γ -射线计数器。

2.5.4.2.3 试剂

^{125}I -血清铁蛋白放射免疫分析试剂盒。

2.5.4.2.4 操作步骤

2.5.4.2.4.1 操作步骤：铁蛋白测定操作程序和试剂用量（mL）

（见下表）

2.5.4.2.4.2 绘制标准曲线

以各标准管的 $\text{B}/\text{B}_0\%$ 作纵坐标，标准铁蛋白浓度为横坐标（对数边）作标准曲线。样品或质控由 $\text{B}/\text{B}_0\%$ 值从曲线上查到相应的含量。

组 别	标准曲线组	待
-----	-------	---

名 称	(T) 总计数值	(NBS) 非特异管	(B ₀) 零标准管	(B) 标准管	测 管
温育液		0.2	0.1		
铁蛋白标准				0.1	
待测血样或质控					0.1
铁蛋白抗体			0.1	0.1	0.1
¹²⁵ I—铁蛋白	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
充分摇匀, 37℃, 温育 1.0 小时					
分离试剂		0.5	0.5	0.5	0.5
充分摇匀, 室温 15 分钟					
3500 转 / 分, 离心 15 分钟, 弃上清液, 测沉淀计数					

2.5.4.2.4.3 结果计算

非特异结合率:

$$\text{NBS (\%)} = \frac{\text{NBS (cpm)} - \text{本底 (cpm)}}{\text{T(cpm)} - \text{本底 (cpm)}} \times 100\%$$

零管结合率:

$$\text{B}_0/\text{T (\%)} = \frac{\text{B}_0(\text{cpm}) - \text{NBS (cpm)}}{\text{T(cpm)} - \text{本底 (cpm)}} \times 100\%$$

标准管(样品、质控)结合率:

$$\text{B/B}_0 (\%) = \frac{\text{B (cpm)} - \text{NBS (cpm)}}{\text{B}_0(\text{cpm}) - \text{NBS (cpm)}} \times 100\%$$

2.5.4.2.4.4 注意事项

本实验为抗原抗体结合反应, 操作时要注意防止可引起抗原、抗体失活的因素(如高温、冰冻等)。

测定时, 要防止液体溅出, 以免造成同位素污染, 使本底值增高。

离心后, 抽去上清液时勿将平铺在管底的免疫复合物吸起, 否则测定结果不准确。

非特异管、零管是为鉴定试剂是否符合规定而设立的。

血清铁蛋白浓度也可用酶联免疫吸附法测定。具体测定方法按相应试剂盒说明书进行。

2.5.4.3 血清运铁蛋白饱和度测定

2.5.4.3.1 原理

血清中加入过量的铁, 使血清中的运铁蛋白全部与铁结合, 达到饱和, 过剩的铁用碳酸镁吸附除去, 然后按测血清铁的方法, 测定总结合的铁量, 即为总铁结合力。从中可计算出未饱和铁量及血清运铁蛋白饱和度。

2.5.4.3.2 血清铁测定

血清铁(SI)是指存在于血清中与血清运铁蛋白结合的铁, 它以高铁的形式附着在血清 pI 球蛋白的转递蛋白上, 成人正常值为 50—184μg/100mL。缺铁性贫血时常低于 50μg/100mL, 当血红蛋白浓度降低不明显时, 血清铁已减少, 被认为是早期缺铁性贫血诊断依据之一。

2.5.4.3.2.1 铬天青 B 铵盐比色法

铬天青 B 铵盐作为显色剂测血清铁, 比过去多采用的联吡啶等作为显色剂有较高的灵敏度, 其克分子吸光系数在 630nm 波长下为 $1.68 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。可大大减少样品血清量, 方法简便, 准确。

2.5.4.3.2.1.1 原理

$\text{Fe}^3 / \text{Fe}^2$ 与铬天青 B (CAB) 和十六烷基三甲基溴化铵 (CTMA) 反应, 形成三元胶囊状络合物使试剂

颜色加深，其颜色加深程度与血清铁含量成正比，在 pH 为 4.6—5.5，波长为 630nm 时，有最大吸收峰，利用柠檬酸为铁的掩蔽剂，样品为自身空白，不需除蛋白，即可测出血清铁的含量。

2.5.4.3.2.1.2 试剂

2.5.4.3.2.1.2.1 缓冲溶液 pH4.75，取 25g 无水醋酸钠，110g 氯化钠，8mL 冰醋酸，用蒸馏水定容至 1000mL。用酸度计测 pH 应为 4.75。

2.5.4.3.2.1.2.2 显色剂

2.5.4.3.2.1.2.2.1 0.1%铬天青 B 铵盐溶液（A 液）：取 0.1g 铬天青 B 铵盐，定容于 100mL 蒸馏水中，放在棕色瓶中可在室温下保存 1 个月。

2.5.4.3.2.1.2.2.2 0.3%十六烷基三甲基溴化铵（B 液）：取十六烷基三甲基溴化铵 0.3g，用蒸馏水定容至 100mL。

2.5.4.3.2.1.2.2.3 显色剂应用液：取 90mL B 液，60mL A 液，小心混匀，用缓冲溶液定容至 1000mL，放在棕色瓶内可保存 1 个月。

2.5.4.3.2.1.2.3 掩蔽剂：称 17.0g 柠檬酸（ $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ），35.0g 柠檬酸钠（ $Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ ），约加 50mL 蒸馏水加热助溶，冷却后定容至 100mL。

2.5.4.3.2.1.2.4 铁标准液

2.5.4.3.2.1.2.4.1 贮备液：3mmol/L，取 1.176g 硫酸亚铁铵（6 分子结晶水）至少量蒸馏水中，加 50mL 浓硝酸混匀反应 10 分钟，用蒸馏水定容至 1000mL。

2.5.4.3.2.1.2.4.2 工作液：30 μ mol/L，取 10mL 贮备液，用蒸馏水定容至 1000mL。

2.5.4.3.2.1.3 方法

按下表加入各种试剂。

	样品管	标准管	空白 1	空白 2	空白 3
血清（mL）	0.1			0.1	
Fe 标（30 μ mol/L）		0.1			
蒸馏水（mL）			0.1		0.1
显色剂应用液（mL）	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
隐蔽剂（mL）				0.1	0.1

混匀，放置 20 分钟，在 721 型分光光度计上，波长 630nm，以空白管调零点记录光密度。

注：①样品管和标准管以空白 1 调 0 点；

②空白管 2 以空白 3 调 0 点。

2.5.4.3.2.1.4 计算

$$\text{血清铁浓度} (\mu\text{mol} / \text{L}) = \frac{\text{样品管光密度} - \text{空白 2 管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 30$$

$$\text{或 血清铁浓度} (\mu\text{g} / 100\text{mL}) = \frac{\text{样品管光密度} - \text{空白 2 管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 167.55$$

2.5.4.3.2.1.5 注意事项

2.5.4.3.2.1.5.1 要求所用器皿用 2N 盐酸浸泡过夜，试剂纯度为分析纯以上，所用蒸馏水为双蒸水或去离子水。

2.5.4.3.2.1.5.2 缓冲液 pH 对结果影响较大，测定时 pH 应保证在 4.70—4.80 之间。

2.5.4.3.2.1.5.3 严格限制波长的选择（需经校下），血清样品在 607—609nm 之间有一个杂质吸收峰。

2.5.4.3.2.2 原子吸收光谱法

用原子吸收光谱法测定生物样品中微量元素的含量具有操作简便、快速、灵敏度较高的优点，故被广泛应用。

2.5.4.3.2.2.1 试剂

2.5.4.3.2.2.1.1 混合酸消化液：4 份硝酸，1 份高氯酸混合即成。

2.5.4.3.2.2.1.2 铁标准溶液

2.5.4.3.2.2.1.2.1 铁标贮备液：取 1.0000g 纯金属铁，用盐酸或硝酸溶解后，用 0.1N 盐酸稀释到 1000mL，移入聚乙烯塑料瓶内，存放在 4℃ 冰箱，1mL 含 1mg 铁。

2.5.4.3.2.2.1.2.2 铁标工作液：取 10mL 贮备液，用 0.1N 盐酸定容至 100mL，1mL=100μg 铁。

2.5.4.3.2.2.2 操作

2.5.4.3.2.2.2.1 样品收集及处理

取静脉血 2mL 于盛有 10mg 草酸钾的 5mL 试管中（于每试管中加入 0.2mL 5% 草酸钾，置烘箱中烤干即成），离心（3000 转/分）15 分钟。将分离出的血浆吸入另一带盖小试管中，备用。

2.5.4.3.2.2.2.2 消化

取 1.0mL 血浆，于 100mL 高型烧杯中，约加 3mL 混合酸消化液，上盖表皿，放置数小时或过夜，在沙浴电热板上徐徐加热煮沸，在冒白色浓烟激烈作用后溶液呈无色或淡黄色。反应終了，取下烧杯（若酸用量不够，最后可出现溶液变黑现象，此时可再加 2 mL 混合酸消化液继续消化直至五色）。冷却后用 10—20mL 去离子水冲洗表皿和杯壁，除去表皿继续加热，直到再度冒白色浓烟，待溶液体积接近蒸干，残留酸量不超过 1mL，取下冷却，用蒸馏水稀释至 3mL。

2.5.4.3.2.2.2.3 测定

吸取 0.0mL，0.5mL，1.0mL，2.0mL，3.0mL，5.0mL 铁标准应用液，用 0.1N 盐酸定容至 100mL，混合，各容量瓶中每 mL 分别相当于 0μg，0.5μg，1μg，2μg，3μg，5μg 铁。

将处理后的样液，试剂空白，铁标系列溶液分别导入火焰进行测定，测定条件（Pekin-Elener403 型原子吸收分光光度计）：波长 248.3nm；空心阴极灯电流：30mA，狭缝宽 0.2mm，空气流量 13.51/min，乙炔流量：5.21/分。以铁含量对应浓度吸光度绘制标准曲线，根据标准曲线求得样品铁含量。

2.5.4.3.2.2.2.4 计算

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times V}{m} \times 100$$

式中：X— 血浆中铁的含量（μg/100mL 血清）。

A₁—测定用样品液中铁的含量（mg/L）。

A₂—测定空白液中铁的含量（mg/L）。

V—样品处理液定容总体积（mL）。

m— 血浆取样量（mL）

2.5.4.3.3 总铁结合量测定

2.5.4.3.3.1 试剂

2.5.4.3.3.1.1 铁标准液

2.5.4.3.3.1.1.1 铬天青 B 铵盐法

2.5.4.3.3.1.1.1.1 贮备液：（3mmol/L）取 1.176g 硫酸亚铁铵（6 分子结晶水）置蒸馏水中，加 50mL 浓硝酸混匀反应 10 分钟，用蒸馏水定容至 1000mL。

2.5.4.3.3.1.1.1.2 工作液：（30μmol/L）取 10mL 贮备液，用蒸馏水定容至 1000mL。

2.5.4.3.3.1.1.2 原子吸收分光光度法

2.5.4.3.3.1.1.2.1 贮备液：取 1.0000g 纯金属铁，用盐酸或硝酸溶解后，用 0.1N 盐酸稀释到 1000mL，移入聚乙烯塑料瓶内，存放 4℃ 冰箱，1mL 含 1mg 铁。

2.5.4.3.3.1.1.2.2 工作液：取 10mL 贮备液，用 0.1N 盐酸定容至 100mL，1mL=100μg 铁。

2.5.4.3.3.2 轻质碳酸镁（AR）（或碱式碳酸镁）其质量应符合要求。

2.5.4.3.3.3 实验步骤

2.5.4.3.3.3.1 应用铬天青 B 铵盐方法测总铁结合量 取 0.1mL 血清放入尖底离心管，加 60μmol/L 铁标准液 0.1mL 充分混合，室温放置 15 分钟。再加 4—5mg 轻质碳酸镁，放置 15 分钟，混合 3—4 次。然后以 3000 转/分离心 5—8 分钟，取上清液 0.1mL 按铬天青 B 铵盐比色法测血清铁的步骤进行操作，计算。

2.5.4.3.3.3.2 原子吸收分光光度法测总铁结合量 取 1.0mL 血清，加铁标准液（20μg/mL）0.5mL，充分混合，放置 15 分钟。加 150mg 轻质碳酸镁，充分混匀 1 分钟以上，放置 30 分钟，混合 3—4 次。离心 10 分钟，取上清液 1mL 按原子吸收分光光度法测血清铁的操作步骤进行消化，测定，计算。

2.5.4.3.3.4 计算

2.5.4.3.3.4.1 血清总铁结合量可用（mg/100L）表示。

2.5.4.3.3.4.2 未饱和铁量=血清总铁结合量—血清铁。

$$\text{血清蛋白运铁蛋白饱和度 (\%)} = \frac{\text{血清铁}}{\text{血清总铁结合量}} \times 100$$

2.5.4.3.4 数据处理及结果判定

实验数据可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

2.5.4.4 红细胞内游离原卟啉：见 1.6.2。

2.5.5 结果判定

受试样品组与对照组比较，血红蛋白升高且平均升高幅度 $\geq 10\text{g/L}$ ，血清铁蛋白增加，血清运铁蛋白饱和度升高，红细胞游离原卟啉降低，经统计处理差异有显著性，即可分别判定该指标结果阳性。

2.6 数据处理及结果判定

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

结果判定

改善儿童缺铁性贫血：试验前后自身比较和试验后组间比较，血红蛋白、红细胞内游离原卟啉二项指标差异有显著性；同时，试食组自身前后比较，血红蛋白平均升高幅度 $\geq 10\text{g/L}$ ，可判定受试样品具有改善缺铁性贫血的作用。

改善成人缺铁性贫血：试验前后自身比较和试验后组间比较，血红蛋白指标差异有显著性；同时，试食组自身前后比较，血红蛋白平均升高幅度 $\geq 10\text{g/L}$ ，血清铁蛋白、红细胞内游离原卟啉/血清运铁蛋白饱和度二项指标中一项指标阳性，可判定该受试样品具有改善缺铁性贫血的作用。

十二、有助于改善痤疮检验方法

1 受试者纳入标准

选择临床痤疮 I—III 度的自愿受试患者，男女均可。

2 受试者排除标准

2.1 年龄在 14 岁以下或 65 岁以上者，妊娠或哺乳期妇女，及对本保健食品过敏者。

2.2 合并有心、肺、脑血管、肝、肾和造血系统等严重性疾病及精神病患者。

2.3 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。

2.4 未按规定服用受试样品的受试者，资料不全影响功效或安全性判断者。

3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的痤疮情况随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、病程等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 30 天，必要时可以延长至 45 天。受试者在试验期间停止使用其它口服及外用有关养颜祛痤疮的用品。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

5 观察指标

5.1 安全性指标

5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

5.1.2 血、尿、便常规检查

5.1.3 肝、肾功能检查

5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（在试验开始时检查一次）

5.2 功效性指标

5.2.1 皮肤油份的测定

用干净棉球蘸蒸馏水清洁被测皮肤部分（以颜面部为主），擦干 15 分钟后测定皮肤油份，测定参照标准：油份：9—27 为正常、<9 为低油、>27 为高油

5.2.2 痤疮皮疹：

观察受试者试食前后整个颜面部位的痤疮皮疹改变情况。

试食前后分别记录颜面部白头粉刺、黑头粉刺、炎性丘疹、脓包、囊肿、结节数目及皮损的程度。

6 数据处理及结果判定

功效判定：

有效：痤疮数量减少 $\geq 30\%$ ，皮损程度减轻一度。

无效：痤疮数目减少 $< 30\%$ ，皮损程度无变化。

根据皮损程度、痤疮数量等临床情况进行分级，对试食前后痤疮数量、皮损程度积分进行统计，同时计算有效率。

皮损程度分级和积分：

I 度：黑头粉刺，散发至多发，炎性丘疹散发。 1 分

II 度：I 度+浅在性脓疱，炎性丘疹数目增加，局限在颜面。 2 分

III 度：II 度+深在性炎性丘疹、结节，发生颜面、颈部、胸背部 3 分

IV 度：III 度+囊肿，易形成疤痕，发生于上半身 4 分

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

有效率采用 χ^2 检验进行检验。四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。有效率采用 χ^2 检验。

结果判定

试食组痤疮数量平均明显减少，且大于等于 20%，皮损程度积分明显减少，差异均有显著性，皮肤油份不显著增加，可判定该受试样品具有有助于改善痤疮的作用。

十三、有助于改善黄褐斑检验方法

1 受试者纳入标准

经体检符合下列条件的自愿受试者。

- 1.1 面部淡褐色至深褐色，界限清楚的斑片，通常对称性分布，无炎性表现及鳞屑。
- 1.2 无明显自觉症状。
- 1.3 主要发生在青春期后，女性多发。
- 1.4 有一定的季节性，夏重冬轻。
- 1.5 无明显内分泌疾病，并排除其它疾病引起的色素沉着。

2 受试者排除标准

- 2.1 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上者，妊娠或哺乳期妇女，过敏体质及对本保健食品过敏者。
- 2.2 合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统等严重疾病及内分泌疾病，精神病患者。
- 2.3 嗜酒者或吸烟者。
- 2.4 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。
- 2.5 未按规定服用受试样品，无法判定功效或资料不全影响功效或安全性判断者。

3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的黄褐斑颜色、面积情况随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如户外活动情况、性别、年龄等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 30 天，必要时可以延长至 60 天。受试者在试验期间停止使用其它口服及外用有关养颜祛斑的用品。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

5 观察指标

5.1 安全性指标

- 5.1.1 一般状况（包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等）
- 5.1.2 血、尿、便常规检查
- 5.1.3 肝、肾功能检查
- 5.1.4 心电图、胸片、腹部 B 超检查（在试验开始前检查一次）

5.2 功效性指标

- 5.2.1 颜面部黄褐斑面积大小检测：用标尺测量受试前后整个颜面部黄褐斑的面积（mm²）
- 5.2.2 颜面部黄褐斑颜色深浅检测：按照中国科学院地理研究所设计研制，测绘出版社 1992 年出版的《实用标准色卡》（第一版）中的棕色（Y+M+BK 即黄+品红+黑的叠色）色卡为黄褐斑深浅的判断标准：I 度（15、20、5），II 度（30、40、10），III 度（40、60、15）

6 数据处理和结果判定

对试食前后黄褐斑颜色积分和面积变化进行统计，同时计算有效率。色卡 I 度、II 度和 III 度分别计 1 分、

2 分和 3 分。

功效判定标准

有效：黄褐斑颜色下降 I 度，面积减少大于 10%，且不产生新黄褐斑。

无效：黄褐斑颜色及面积无明显变化

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

有效率采用 χ^2 检验进行检验。四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。有效率采用 χ^2 检验。

结果判定

试食组黄褐斑面积平均减少，且大于等于 10%，颜色积分明显下降，自身前后比较及与对照组比较，差异均有显著性，且不产生新的黄褐斑，可判定该受试样品具有有助于改善黄褐斑的作用。

十四、有助于改善皮肤水份状况检验方法

1 受试者纳入标准

30—50 岁，采用公认的专业皮肤水份测定仪，选择皮肤水份偏低者作为纳入标准。

2 受试者排除标准

- 2.1 妊娠或哺乳期妇女，过敏体质及对本保健食品过敏者。
- 2.2 合并有心脑血管、肝、肾、造血系统性疾病和精神病史者。
- 2.3 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。
- 2.4 未按试验要求服用受试样品，无法判定功效或资料不全影响功效或安全性判断者。

3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的皮肤水份情况随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组服用等量安慰剂。受试样品给予时间 30 天，必要时可以延长至 45 天。受试者在试验期间不得服用其它保持皮肤水份的物品及影响结果判定的化妆品。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

5 观察指标：

5.1 安全性指标

- 5.1.1 一般状况（包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等）
- 5.1.2 血、尿、便常规检查
- 5.1.3 肝、肾功能检查
- 5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（在试验开始时检查一次）

5.2 功效性指标

测试前额眉间皮肤的水份。

测定环境：在宽敞、通风条件良好，温度、湿度等空间环境稳定的检查室进行。

在安静状态下用洁净棉球蘸蒸馏水清洁被测部位，擦干后 15 分钟进行水份的测定，试食前后测定工作由同一台仪器、同一人操作。

6 数据处理和结果判定

对试食前后皮肤水份变化进行统计。

功效判定标准

有效：水份得到改善，并经统计学检验有显著性差异。

无效：水份没有得到显著改善。

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

结果判定

试食组皮肤水份明显改善，试食前后自身比较及与对照组比较，差异均有显著性，可判定该受试样品具有有助于改善皮肤水份状况的作用。

十五、有助于调节肠道菌群检验方法

1 动物实验

1.1 实验动物

推荐用近交系小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

1.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 14 天，必要时可以延长至 30 天。

1.3 实验步骤

在给予受试样品之前，无菌采取小鼠肛门内粪便 0.1g，10 倍系列稀释，选择合适的稀释度分别接种在各培养基上。培养后，以菌落形态、革兰氏染色镜检、生化反应等鉴定计数菌落，计算出每克湿便中的菌数，取对数后进行统计处理。最后一次给予受试样品之后 24h，与实验前同样方式取直肠粪便，检测肠道菌群，方法同上。

1.4 观察指标

体重、双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌。

1.5 数据处理和结果判定

资料可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

比较实验前后自身及组间双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌的变化情况，实验组实验前后自身比较差异有显著性，或实验后实验组与对照组组间比较差异有显著性、且实验组实验前后自身比较差异有显著性，符合以下任一项，可以判定该受试样品动物实验结果阳性。

1.5.1 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌、肠球菌无明显变化。

1.5.2 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌和/或肠球菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌/乳杆菌增加的幅度。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

2.1.1 一个月内未患过胃肠疾病者。

2.1.2 一个月内未服用过抗生素者。

2.2 受试者排除标准

2.2.1 年龄在 65 岁以上者，妊娠或哺乳期妇女，过敏体质及对本保健食品过敏者。

2.2.2 合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统等严重疾病及内分泌疾病，精神病患者。

2.2.3 停服受试样品或中途加服其它药物，无法判断功效或资料不全者。

2.2.4 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。

2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的菌群状况随机分为试食和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、饮食因素等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 14 天，必要时可以延长至 30 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.5 观察指标

2.5.1 安全性指标：

- 2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等
- 2.5.1.2 血、尿、便常规检查
- 2.5.1.3 肝、肾功能检查（仅在试验开始前检查一次）
- 2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（仅在试验开始前检查一次）
- 2.5.2 功效性指标：双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌。

2.6 试验步骤：在给予受试样品之前，无菌采取受试者粪便 1.0g，10 倍系列稀释，选择合适的稀释度分别接种在各培养基上。培养后，以菌落形态、革兰氏染色镜检、生化反应等鉴定计数菌落，计算出每克湿便中的菌数，取对数后进行统计处理。最后一次给予受试样品之后 24h，再次检测，方法同上。

2.7 数据处理和结果判定

试验数据为计量资料，可用 *t* 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 *t* 检验，两组均数比较采用成组 *t* 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 *t* 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 *t'* 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 *CV*>50%）的资料应用秩和检验。

符合以下任一项，且试验组试食前后自身比较及试食后试食组与对照组比较，差异均有显著性，可以判定该受试样品具有有助于调节肠道菌群的作用。

- 2.7.1 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌、肠球菌、拟杆菌无明显变化。
- 2.7.2 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌和/或肠球菌、拟杆菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌/乳杆菌增加的幅度。

附：肠道菌群检验用培养基和培养方法（动物和人体通用）

项目	培养基	培养条件	鉴定方法
肠杆菌	伊红美蓝琼脂	36±1℃培养 24h	计数发酵乳糖、染色镜 检为 G ⁻ 杆菌的所有菌落
肠球菌	叠氮钠—结晶紫 —七叶苷琼脂	36±1℃培养 48h	计数有明显褐色圈、染色镜检为 G ⁺ 球菌的所有 菌落

双歧杆菌	BBL 琼脂	36±1℃48h 厌氧培养	食品卫生微生物检验 双歧杆菌检验 (GB 报批稿)
乳杆菌	LBS 琼脂	36±1℃48h	G ⁺ 无芽孢杆菌 过氧化氢酶阴性 API CH50
产气荚 膜梭菌	TSC 琼脂	36±1℃ 24h 厌氧培养	计数所有在紫外光下有 荧光的黑色菌落
拟杆菌	改良 GAM 琼脂	36±1℃48 h 厌氧培养	G ⁻ 无芽孢杆菌 商业微生物生化鉴定系统

培养基成分和制法

肠杆菌培养基（伊红美蓝琼脂 EMB）

成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	17g
2%伊红 Y 溶液	20mL
0.65%美蓝溶液	10mL
蒸馏水	1000mL
pH7.1	

制法：

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中，调整 pH，分装于烧瓶内，121℃ 高压灭菌 15min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂，冷却至 50～55℃，加入伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平板。

肠球菌培养基（叠氮钠—结晶紫—七叶苷琼脂）

成分

多价胨	10g
酵母浸膏	5g
氯化钠	5g
磷酸氢二钾	4g
磷酸二氢钾	1.5g
叠氮化钠	0.5g
七叶苷	1g
0.05%结晶紫水溶液	0.4mL
柠檬酸铁铵	0.5g

琼脂	20~30g
蒸馏水	1000mL
pH8.0	

制法:

将上述成分溶解于蒸馏水中, 调整 pH, 分装后, 121℃ 高压灭菌 15min 备用。

拟杆菌选择性培养基 (改良 GAM 琼脂)

成分

标胨	15g
大豆胨	3g
消化血清粉	13.5g
酵母浸膏	5g
牛肉膏	2g
牛肝膏	1.2g
葡萄糖	3g
磷酸二氢钾	2.5g
氯化钠	3g
可溶性淀粉	3g
L—半胱氨酸	0.3g
硫乙醇酸钠	0.15g
胰蛋白胨	10g
琼脂	15~18g
蒸馏水	
pH 7.2	

制法:

- 1 将上述成分溶解于蒸馏水中, 调整 pH, 分装后, 115℃ 高压灭菌 15min, 冷却至 50℃ 左右, 加入混合抗生素 1 mL/L, 0.1% 维生素 K₁ 溶液 1 mL/L, 氯化血红素 2.5 mL/L, 脱纤维兔血 70 mL/L, 混匀后倾注平板。
- 2 混合抗菌素的配制: 将卡那霉素 100mg、新霉素 100mg、万古霉素 1 mg 装入小瓶内, 加入 1 mL 无菌蒸馏水, 充分溶解后, 备用。

产气荚膜梭菌选择性培养基 (TSC 琼脂)

成分

胰蛋白胨	15g
大豆蛋白胨	5g
酵母浸膏	5g
无水亚硫酸钠	1g
枸橼酸铁胺	1g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL
pH7.6	

制法:

将各成分溶于蒸馏水中, 调整 pH 至 7.6, 121℃ 高压灭菌 10min, 冷却至 50℃ 左右, 每 250mL 基础溶液中加入 20mL D-环丝氨酸溶液, 混匀后倾注平板。

D-环丝氨酸溶液配制：溶解 1g D-环丝氨酸于 200mL 蒸馏水，膜过滤除菌后，于 4℃ 冷藏保存备用。

双歧杆菌选择性培养基（BBL 琼脂）

成份

蛋白胨	15.0g
酵母粉	2.0g
葡萄糖	20.0g
可溶性淀粉	0.5g
氯化钠	5.0g
5%半胱氨酸	10.0mL
西红柿浸出液	400.0mL
吐温 80	1.0mL
肝提取液	80.0mL
琼脂	20.0g
蒸馏水	520.0mL

pH7.0

制法：

西红柿浸出液的制备：将新鲜西红柿洗净称重后切碎，加等量蒸馏水在 100℃ 水浴中加热，时时搅拌，约 90min，然后用绒布过滤，校正 pH7.0，分装三角瓶，115℃ 高压灭菌 15—20min。

肝提取液的制备：称取新鲜猪肝 1000g，切成小块或绞碎，加蒸馏水至 2000mL，混匀，置冰箱中过夜。第二天煮沸 15—20min，绒布过滤，并挤压收集全部滤液，加水补足原量。分装三角瓶，115℃ 高压灭菌 15—20min。

将上述成分配制，调整 pH 7.0，分装三角瓶，115℃ 高压灭菌 15—20min。

乳杆菌选择性培养基（LBS 琼脂）

成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	10g
酵母粉	2g
葡萄糖	20g
吐温 80	1mL
磷酸氢二钾	2g
乙酸钠	5g
枸橼酸三氨	2g
硫酸镁	0.2g
硫酸锰	0.05g
琼脂	25g
蒸馏水	1000mL

pH6.0~6.5

制法：

将上述成分溶解于蒸馏水中，调整 pH，分装于烧瓶内，115℃ 高压灭菌 15—20min 备用。

稀释液

0.5% L-半胱氨酸	0.5mL
-------------	-------

吐温 80	1.0mL
酵母粉	0.5g
蒸馏水	1000mL

pH 7.0—7.2

115℃ 高压灭菌 20min 备用。

十六、有助于消化检验方法

1 动物实验

1.1 实验原理

胃肠道是营养物质的摄取、消化与吸收的器官，对食物的消化作用主要是依靠其运动、消化酶的分泌来完成的。如果某一保健食品能对这一环节或几环节有调节作用，就可能具有有助于消化的作用。

1.2 实验项目

促进消化功能动物实验包括大鼠体重、体重增重、摄食量和食物利用率实验；小肠运动实验；消化酶的测定等三部分。

1.3 实验动物

根据实验项目可选用单一性别成年小鼠或大鼠。小鼠 18—22 克，每组 10—15 只，大鼠 120—150 克，每组 8—12 只。

1.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组（或空白对照组），以人体推荐量的 10 倍（小鼠）或 5 倍（大鼠）为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组和模型对照组。受试样品给予时间 30 天（小肠运动实验受试样品给予时间 15—30 天），必要时可延长至 45 天。

1.5 实验内容

1.5.1 体重、体重增重、摄食量和食物利用率

选用同一性别的大鼠。实验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 10%。分不同剂量实验组和阴性对照组，经口给予受试样品，每周测 2 次体重和食物摄入量。实验结束时计算体重、体重增重、摄食量和食物利用率。

1.5.2 小肠运动实验

选用同一性别的小鼠，分不同剂量实验组、空白对照组和模型对照组，模型对照组用复方地芬诺酯（或洛哌丁胺 2~4mg/kg BW）造模。可用墨汁或炭末加阿拉伯树胶作为指示剂。经口给予受试样品。实验结束前禁食不禁水 16 小时，于测定当天各实验组和空白及模型对照组再给予一次受试样品或蒸馏水，30 分钟后各实验组和模型对照组给予复方地芬诺酯（0.025%—0.05%），空白对照组给予蒸馏水，30 分钟后各组再给予指示剂，25 分钟后断颈处死动物，计算墨汁推进率。

按下式计算墨汁推进率：

$$\text{墨汁推进率} = \frac{\text{墨汁推进长度 (cm)}}{\text{小肠总长度 (cm)}} \times 100\%$$

1.5.3 消化酶的测定

选用同一性别的大鼠。分不同剂量实验组和阴性对照组，实验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 10%。经口给予受试样品。实验结束前各组动物禁食不禁水 24 小时，采用乙醚（或异氟烷）麻醉大鼠幽门结扎法收集一定时间内排出的胃液，测定单位时间内胃液量。取胃液 1mL 放入 50mL 的三角烧瓶中，加入 0.05mol/L 盐酸溶液 15mL 摇匀，放入新鲜制作的蛋白管两根。塞好瓶口，在 37℃ 恒温箱中孵育 24 小时，取

出蛋白管，用尺测量蛋白管两端透明部分的长度（mm），以四端之值求其平均值。计算胃蛋白酶活性和胃蛋白酶排出量。

胃蛋白酶活性单位（ μ/mL ）= 四端蛋白管透明部分长度均值²×16

胃蛋白酶排出量（ μ/h ）= 胃蛋白酶活性×每小时胃液量

1.6 数据处理和结果判定

计量资料可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

食物利用率和墨汁推进率资料需进行数据转换， $X = \sin^{-1} \sqrt{p}$ ，式中 P 为食物利用率和墨汁推进率，用小数表示，然后再进行方差分析。

1.6.1 体重、体重增重、摄食量和食物利用率

实验组与阴性对照组比较，体重、体重增重、摄食量三项指标中任一指标增加，经统计处理差异有显著性，且食物利用率与阴性对照组比较不明显降低，可判定该实验结果阳性。

1.6.2 小肠运动实验

在模型成立的前提下，实验组与模型对照组比较，墨汁推进率增加，经统计处理差异有显著性，可判定该实验结果阳性。

1.6.3 消化酶的测定

实验组与阴性对照组比较，胃液量、胃蛋白酶活性，胃蛋白酶排出量三项指标中任一指标增加，经统计处理差异有显著性，可判定该实验结果阳性。

结果判定

动物体重、体重增重、摄食量、食物利用率，小肠运动实验和消化酶测定三方面中任二方面实验结果阳性，可判定该受试样品动物实验结果阳性。

2. 人体试食试验

根据不同受试样品适应人群的区别，有助于消化人体试食试验建立两套试食试验方案，即针对适应人群主要为儿童的儿童方案和适应人群主要为成人的成人方案。

2.1 儿童方案

2.1.1 受试者纳入标准：受试者选择由单纯饮食不佳造成的体重在同龄平均正常体重值小于 1 个标准差以内，伴有食欲低下、食量减少、偏食等消化不良表现的 4—10 岁儿童。

2.1.2 受试者排除标准

2.1.2.1 急、慢性腹泻者。

2.1.2.2 粪便常规检查虫卵阳性者。

2.1.2.3 合并有心血管、肝、肾和造血系统等全身性疾病者。

2.1.2.4 短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果判断者。

2.1.2.5 未坚持服用受试样品者。

2.1.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者体重、血红蛋白、进食量等随机分为试食组和对照组，尽可能

考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、家庭经济水平等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者有效例数不少于 50 例。

2.1.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或具有同样作用的阳性物。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。按盲法进行试食试验。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.1.5 观察指标

2.1.5.1 安全性指标

2.1.5.1.1 一般体格检查：试验前应询问和查阅受试儿童健康卡片，了解受试儿童的睡眠、精神情况。对所有儿童进行常规体格检查。

2.1.5.1.2 血常规：红细胞计数、白细胞计数。

2.1.5.1.3 尿常规：比重、pH 值、白细胞。

2.1.5.1.4 粪便常规：虫卵检查（试食开始前检查一次）。

2.1.5.2 功效性指标

2.1.5.2.1 食欲：分为食欲佳，食欲可，食欲差三级。

2.1.5.2.2 进食量：采用 3 天膳食调查法。记录试食开始前和试食结束前 3 天各受试儿童的总进食量（包括主食、副食、蔬菜和水果），以连续 3 天观察计算出 1 天平均的进食量。

2.1.5.2.3 偏食：分为无偏食，中等偏食，偏食三级。

2.1.5.2.4 体重测量和血红蛋白含量的测定：测定试食前后的体重和血红蛋白变化。

2.1.6 数据处理和结果判定

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

2.1.6.1 食欲改善：食欲评价分为食欲佳（进餐时有食欲，喜欢吃饭，3 分）；食欲可（进餐时能吃饭但比同龄儿童少，2 分），食欲差（进餐时不愿吃饭，比同龄儿童明显减少，1 分）三级。

试食前后试食组自身比较，食欲评分明显增加，试食后试食组与对照组比较，食欲评分或其试验前后的差值增加，经统计处理差异有显著性，可判定该指标阳性。

2.1.6.2 进食量改善：试食前后试食组自身比较进食量明显增加，试食后试食组与对照组比较，进食量或其试验前后的差值增加，经统计处理差异有显著性，可判定该指标阳性。

2.1.6.3 偏食改善：偏食评价分为无偏食（进餐时不挑食，3 分），中等偏食（进餐时挑食但在劝说下能进食，2 分），偏食（进餐时挑食严重，在劝说下仍不进食，1 分）三级。

试食前后试食组自身比较，偏食评分明显增加，试食后试食组与对照组比较，偏食评分或其试验前后的差值增加，经统计处理差异有显著性，可判定该指标阳性。

2.1.6.4 体重测量和血红蛋白含量的测定

试食前后试食组自身比较，体重或血红蛋白明显增加，试食后试食组与对照组比较，体重或血红蛋白明显增加，经统计处理差异有显著性，可判定体重或血红蛋白指标阳性。

2.2 成人方案

2.2.1 受试者纳入标准

选择功能性消化不良，伴有长期胃肠不适，主诉食欲不振，早饱、气多，胃肠胀满，呕吐，不明原因慢性腹泻或大便秘结等自愿受试者。

2.2.2 受试者排除标准

- 2.2.2.1 急性腹泻者。
- 2.2.2.2 严重器质性病变引起的消化不良者。
- 2.2.2.3 体质虚弱无法接受试验者。
- 2.2.2.4 合并有心血管、肝、肾和造血系统等严重全身性疾病患者。
- 2.2.2.5 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。
- 2.2.2.6 未按要求服用受试样品，无法判断试食结果者。

2.2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按受试者的消化症状轻重随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、病程等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者有效例数不少于 50 例。

2.2.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组用安慰剂或空白对照，也可用具有同样作用的阳性物。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.2.5 观察指标

2.2.5.1 安全性指标

- 2.2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等
- 2.2.5.1.2 血、尿便常规检查
- 2.2.5.1.3 肝、肾功能检查
- 2.2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（在试验开始前检查一次）

2.2.5.2 功效性指标

2.2.5.2.1 临床症状观察：准确记录受试者试验前后的临床症状，按下表给予量化评分，比较试验前后症状积分的变化。

2.2.5.2.2 胃/肠运动试验：所有受试者在试验前、试验结束时均进行胃/肠运动检查，推荐用钡条透视法（在进食的条件下检查）。

2.2.6 数据处理和结果判定

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

表 临床症状积分

症状	轻（1 分）	中（2 分）	重（3 分）
腹痛	持续时间短，不需服药	疼痛时间较长，每日超 4 小时，尚能忍受	疼痛较重，持续，需服药才能减轻
嗳气	间有发作	经常发作，引及两胁不适	频繁发作，引及两胁疼痛
泛酸	偶有吐酸	饮食不适即吐酸	频繁吐酸
腹胀	腹胀在短时间内较甚	腹胀较甚，在较长时间内不缓解	整日腹胀
食欲	食欲较差，饭量减少 1/2 以内	食欲差，饭量减少 1/2～2/3	无食欲，饭量减少 2/3 以上

腹泻或便秘	偶有腹泻或便秘	饮食不适即腹泻或便秘	频繁腹泻或便秘
-------	---------	------------	---------

2.2.6.1 临床症状结果判定

试食前后试食组自身比较及试食后试食组与对照组组间比较，临床症状积分明显减少，经统计处理差异有显著性，可判定该指标阳性。

2.2.6.2 胃/肠运动试验结果

试食前后试食组自身比较及试食后试食组与对照组组间比较，胃/肠运动试验指标明显改善，经统计处理差异有显著性，可判定该指标阳性。

结果判定

针对改善儿童消化功能的，食欲、进食量、偏食改善结果阳性，体重和血红蛋白二项指标中一项指标结果阳性，可判定该受试样品具有有助于消化的作用。

针对改善成人消化功能的，临床症状明显改善，胃/肠运动实验结果阳性，可判定该受试样品具有有助于消化的作用。

十七、有助于润肠通便检验方法

1 动物实验

1.1 小肠运动实验

1.1.1 原理

经口灌胃给予造模药物复方地芬诺酯或洛哌丁胺，建立小鼠小肠蠕动抑制模型，计算一定时间内小肠的墨汁推进率，来判断模型小鼠胃肠蠕动功能。

1.1.2 仪器和材料

1.1.2.1 仪器和试剂

手术剪、眼科镊、直尺、注射器、天平、活性炭粉、阿拉伯树胶、复方地芬诺酯或洛哌丁胺。

1.1.2.2 试剂配制

1.1.2.2.1 墨汁的配制：准确称取阿拉伯树胶 100g，加水 800mL，煮沸至溶液透明，称取活性炭（粉状）50g 加至上述溶液中煮沸三次，待溶液凉后加水定容到 1000mL，于冰箱中 4℃ 保存，用前摇匀。

1.1.2.2.2 复方地芬诺酯混悬液的配制：浓度为 0.025%。

复方地芬诺酯片，每片含复方地芬诺酯 2.5mg，取复方地芬诺酯片 25mg（10 片），用研钵研碎呈粉末后加水至 100mL，临用前配制。

1.1.2.2.3 洛哌丁胺溶液的配制

洛哌丁胺剂量为 2—4mg/kg BW。依据洛哌丁胺的实用剂量取用，按实验所需浓度配制，可加热待溶质完全溶解、充分摇匀后使用。

1.1.3 实验方法

1.1.3.1 实验动物

选用成年雄性小鼠，体重 18—22g，每组 10—15 只。

1.1.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组，一个阴性对照组和一个模型对照组。以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。阴性对照组和模型对照组同样途径给蒸馏水。受试样品给予时间 7 天，必要时可延长至 15 天。

1.1.3.3 实验步骤

1.1.3.3.1 模型的建立

给受试样品 7 天后，各组小鼠禁食不禁水 16 小时。

模型对照组和三个剂量组灌胃给予复方地芬诺酯（5mg/kg BW）或洛哌丁胺（2~4mg /kg BW），空白对照组给蒸馏水。

1.1.3.3.2 指标测定的方法

给复方地芬诺酯或洛哌丁胺后 0.5 小时后，剂量组分别给予含相应受试样品的墨汁（含 5%的活性炭粉、10%阿拉伯树胶），阴性和模型对照组给墨汁灌胃。

25 分钟后立即脱颈椎处死动物，打开腹腔分离肠系膜，剪取上端自幽门、下端至回盲部的肠管，置于托盘上，轻轻将小肠拉成直线，测量肠管长度为“小肠总长度”，从幽门至墨汁前沿为“墨汁推进长度”。按下式计算墨汁推进率：

$$\text{墨汁推进率(\%)} = \frac{\text{墨汁推进长度 (cm)}}{\text{小肠总长度 (cm)}} \times 100\%$$

1.1.4 数据处理及结果判定

墨汁推进率需进行数据转换, $X = \sin^{-1} \sqrt{p}$, 式中 P 为墨汁推进率, 用小数表示。在进行方差分析时, 需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 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; 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。

在模型成立的前提下, 受试样品组小鼠的墨汁推进率显著高于模型对照组的墨汁推进率时, 可判定该项实验结果阳性。

1.2 排便时间、粪便粒数和粪便重量的测定

1.2.1 原理

经口灌胃给予造模药物复方地芬诺酯或洛哌丁胺, 建立小鼠便秘模型, 测定小鼠的首粒排黑便排便时间、5 或 6 小时内排便粒数和排便重量, 来反映模型小鼠的排便情况。

1.2.2 仪器和材料

1.2.2.1 仪器和试剂

眼科镊、注射器、分析天平、活性炭粉、阿拉伯树胶、复方地芬诺酯、洛哌丁胺。

1.2.2.2 试剂配制

1.2.2.2.1 墨汁的配制: 同小肠运动实验。

1.2.2.2.2 复方地芬诺酯混悬液的配制: 浓度为 0.05%。

复方地芬诺酯片, 每片含 2.5mg 复方地芬诺酯。

取复方地芬诺酯片 50mg (20 片), 用研钵研碎后加蒸馏水至 100mL, 临用前配制。

1.2.2.2.3 洛哌丁胺溶液的配制:

洛哌丁胺剂量为 4—7mg/kg BW。依据洛哌丁胺的实用剂量取用, 按实验所需浓度配制, 可加热待溶质完全溶解、充分摇匀后使用。

1.2.3 实验方法

1.2.3.1 实验动物

选用成年雄性小鼠, 体重 18—22g, 每组 10—15 只。

1.2.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组, 一个阴性对照组和一个模型对照组。以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组, 另设二个剂量组, 必要时设阳性对照组。阴性对照组和模型对照组同样途径给蒸馏水。受试样品给予时间 7 天, 必要时可适当延长至 15 天。

1.2.3.3 实验步骤

1.2.3.3.1 模型的建立

给受试样品 7 天后, 各组小鼠禁食不禁水 16 小时。

阴性对照组给蒸馏水, 模型对照组和三个剂量组灌胃给予复方地芬诺酯 (10mg/kg BW) 或洛哌丁胺 (4~7mg/kg BW)。

1.2.3.3.2 指标测定的具体方法

给复方地芬诺酯或洛哌丁胺 0.5 小时后, 阴性对照组和模型对照组小鼠用墨汁灌胃, 剂量组给予含受试样品的墨汁, 动物均单笼饲养, 正常饮水进食。

从灌墨汁开始, 记录每只动物首粒排黑便时间、5 或 6 小时内排黑便粒数及重量。

1.2.4 数据处理及结果判定

资料可用方差分析, 需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论:

各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

在小肠便秘模型成立的前提下，受试样品组小鼠的首粒排黑便时间明显短于模型对照组，即可判定该项指标结果阳性。

5 或 6 小时内排黑便粒数明显高于模型对照组，可判定该项指标结果阳性。

5 或 6 小时内排黑便重量明显高于模型对照组，可判定该项指标结果阳性。

1.2.5 结果判定

5 或 6 小时内排粪便重量和粪便粒数任一项结果阳性，同时小肠运动实验和排便时间任一项结果阳性，可判定该项实验结果阳性。

1.2.6 注意事项

1.2.6.1 实验中应将复方地芬诺酯悬液不断振荡，以保持其浓度均一。洛哌丁胺溶液在 4℃ 保存有时会出现结晶，放置室温一段时间或加热后可溶解。

1.2.6.2 墨汁配制时待阿拉伯胶加热透明后再加入碳末。

1.2.6.3 应去除小鼠排出第一粒黑便前的粪便。

1.3 粪便性状感官描述

2 人体试食试验

2.1 纳入受试者标准

2.1.1 排便次数减少和粪便硬度增加者。

2.1.2 大便一周少于 3 次者。

2.1.3 无器质性便秘者。

2.1.4 习惯性便秘者。

2.2 受试者排除标准

2.2.1 不能经口进食者或不能按规定服用受试样品者。

2.2.2 主诉不清者。

2.2.3 体质虚弱无法进行试验者。

2.2.4 30 天内进行过外科手术引起便秘症状发生者。

2.2.5 因严重器质病变引起的近期排便困难者（结肠癌，严重的肠炎、肠梗阻，炎症性肠病等）

2.2.6 便秘困难并伴有疼痛者。

2.2.7 30 天内发生过急性胃肠道疾病者。

2.2.8 孕期及经期妇女。

2.2.9 合并有心血管、肝、肾和造血系统等严重全身疾病患者。

2.2.10 有其它伴随疾病正在治疗者。

2.2.11 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。

2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间对照两种试验设计。按受试者的便秘症状（排便次数、粪便性状、症状持续时间等）随机分为试食组和对照组，尽可能考虑到影响结果的主要因素如年龄、性别、日常饮食、便秘原因等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照，也可服用具有同样作用的阳性物。按盲法进行试食试验。受试样品给予时间 7 天，必要时可以延长至 15 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.5 观察指标：

2.5.1 安全性指标

2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查

2.5.1.4 胸片、心电图、腹部部 B 超（在试验开始前检查一次）

2.5.2 功效性指标

每日对受试者进行询问并记录，同时记录受试者服用受试样品前 6 天及试验时的情况。

2.5.2.1 每日排便次数

记录受试者试食前后排便次数的变化。

2.5.2.2 排便状况

根据排便困难程度（腹痛或肛门烧灼感、下坠感、不适感，有否便频但排便困难而量少等症状）分为 I—IV 级，统计积分值。

I 级（0 分）：排便正常

II 级（1 分）：仅有下坠感、不适感

II 级（2 分）：下坠感、不适感明显，或有便频但排便困难而量少，较少出现腹痛或肛门烧灼感

IV 级（3 分）：经常出现腹痛或肛门烧灼感，影响排便

2.5.2.3 粪便性状

根据布里斯托（Bristol）粪便性状分类法将粪便性状分为 I—III 级。

I 级（0 分）：像香肠或蛇，平滑而且软；像香肠，但在它的表面有裂痕；软的团块，有明显的边缘（容易排出）

II 级（1 分）：香肠形状，但有团块；松散的块状，边缘粗糙，像泥浆状的粪便

III 级（2 分）：分离的硬团，像果核（不易排出）

2.5.2.4 日常饮食情况：纤维素类食物的比例。

2.5.2.5 记录有无不良反应（恶心、胀气、腹泻、腹痛及粪便异常等）。

2.6 数据处理和结果判定

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

试食前后试食组自身比较排便次数明显增加，排便状况和粪便性状二项指标中一项指标积分明显下降，差异有显著性，试食后试食组与对照组比较，排便次数、排便状况和粪便性状任一项明显改善，差异有显著性，可判定该受试样品具有有助于润肠通便的作用。

十八、辅助保护胃粘膜检验方法

1 动物实验

1.1 原理

在一定时间内给予一定量的受试样品，用对胃粘膜有损伤作用的物质造成急性胃粘膜损伤模型，观察各剂量组胃粘膜的损伤程度；或用对胃粘膜有损伤作用的物质造成慢性胃溃疡模型，在一定时间内给予一定量的受试样品，观察各剂量组胃溃疡的面积和体积，反映受试样品对胃粘膜的辅助保护作用。

1.2 实验动物

选用 SD 或 Wistar 健康大鼠，单一性别，180—220 克，每组 8—12 只。

1.3 实验设计及剂量分组

受试物设三个剂量组，其中一个应为人体推荐量的 5 倍剂量组，并同时设置正常对照组。不同的损伤模型，还应设置相应的模型对照组。慢性溃疡模型应先造模，手术次日再分组。受试样品给予时间一般为 14—30 天，必要时可以延长至 45 天。

1.4 胃粘膜损伤模型

1.4.1 急性胃粘膜损伤无水乙醇模型

1.4.1.1 实验动物：选用 Wistar 或 SD 健康大鼠，单一性别。

1.4.1.2 实验试剂及器材：无水乙醇、甲醛、解剖器械、游标卡尺、病理制片系统、显微镜等。

1.4.1.3 实验方法：动物随机分空白对照组、模型组和受试样品三个剂量组。各剂量组灌胃样品 30 天后，全部动物严格禁食 24 小时（不禁水），此期间亦禁止给予受试物。除空白对照外，所有试验组动物给予无水乙醇 1.0mL/只，1 小时后处死动物，暴露完整胃，结扎幽门，灌注适量 10%福尔马林溶液，固定 20min，然后沿胃大弯剪开，洗净胃内容物，展开胃粘膜，在体视解剖显微镜下或肉眼下用游标卡尺测量出血点或出血带的长度和宽度。因宽度所代表损伤的严重性远较长度大，故双倍积分。其评分标准见表 1。

表 1 急性无水乙醇损伤大体观察评分标准

损伤程度	1 分	2 分	3 分	4 分
出血点	1 个	-	-	-
出血带长度	1—5mm	6—10mm	10—15mm	>15mm
出血带宽度	1—2mm	>2mm	-	-
总积分 = 出血点分值+长度分值+（宽度分值×2）				

观察指标：各实验组胃粘膜损伤程度以损伤发生率（%）、损伤积分指数和损伤抑制率（%）表示。损伤发生率（%）=某组出现出血或溃疡的大鼠数量 / 该组大鼠数量×100%；损伤积分指数 = 组损伤评分总和 / 组动物数量；损伤抑制率（%）= (A-B)/A×100%（A、B 分别为模型组与试验组的损伤积分）。

组织病理学观察及评分：大体检查完毕，将每只动物胃粘膜损伤最严重的部位切下，固定于 10%甲醛溶液，常规制片，HE 染色，镜下观察。注意选择胃粘膜正横切面，包括粘膜全层的区域观察。评分方法：以充血、出血、粘膜细胞变性坏死在整个粘膜上皮层的累及程度分为 5 级。充血权重为 1，出血权重为 2，上皮细胞变性坏死权重为 3，评分标准及病变总积分公式见表 2。

表 2 急性胃粘膜损伤组织病理学检查评分标准

病变	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分
充血	<1/5	1/5—2/5	2/5—3/5	3/5—4/5	上皮全层
出血	<1/5	1/5—2/5	2/5—3/5	3/5—4/5	上皮全层
上皮细胞变性坏死	<1/5	1/5—2/5	2/5—3/5	3/5—4/5	上皮全层
病变总积分 = 充血积分+出血积分×2+上皮细胞变性坏死积分×3					

1.4.2 急性胃粘膜损伤消炎痛模型

1.4.2.1 实验动物：选用 Wistar 或 SD 健康大鼠，单一性别。

1.4.2.2 实验试剂及器械：消炎痛、甲醛、解剖器械、游标卡尺、病理制片系统、显微镜等。

1.4.2.3 实验方法：动物随机分空白对照组、模型组和受试样品三个剂量组，灌胃给予动物受试物 30 天后，禁食不禁水 24 小时，模型组和剂量组给予消炎痛 40mg/kg 一次性腹腔注射。5 小时后处死动物，剖腹将胃取出，结扎幽门和贲门，从十二指肠与幽门部结合处注入 10% 甲醛溶液 5 mL，固定 20 分钟后，沿胃大弯剪开，洗净胃内容物，展开胃粘膜，用纸吸干，观察胃粘膜损伤程度。用游标卡尺测量胃出血或溃疡的最大长度及宽度，以出血或溃疡的最大长宽径作为损伤指标评分。消炎痛所致胃粘膜损伤的溃疡一般较小，肉眼观查以点状多见，其评分标准见表 3。

表 3 急性胃粘膜损伤消炎痛模型大体观察评分标准

损伤形态	1 分	2 分	3 分	4 分
出血点	1 个	-	-	-
出血带长度	1—2mm	2—4mm	4—6mm	>6mm
出血带宽度	1—2mm	>2mm	-	-
总积分 = 出血点分值+长度分值+（宽度分值×2）				

注：长度和宽度均以最大径计。

观察指标：各实验组胃粘膜损伤程度以损伤发生率（%）、损伤指数和损伤抑制率（%）表示。损伤发生率（%）= 某组出现出血或溃疡的大鼠数量 / 该组大鼠数量×100%；损伤指数 = 组损伤评分总和 / 组动物数量；损伤抑制率（%）= (A-B)/A×100%（A、B 分别为模型组与试验组的损伤积分）

组织病理学观察及评分：同急性胃粘膜损伤无水乙醇模型。

1.4.3 慢性胃溃疡模型

1.4.3.1 动物：选用 Wistar 或 SD 健康大鼠，单一性别。

1.4.3.2 实验试剂及器材：冰醋酸、解剖镜、微量注射器等。

1.4.3.3 实验方法：

1.4.3.3.1 醋酸注射法：将动物禁食不禁水 24 小时，乙醚或水合氯醛或戊巴比妥钠麻醉后，消毒腹部，于剑突下切开腹腔，将胃轻拉出腹腔外，用微量注射器于胃幽门处浆膜下注射 20—30μL 的 30% 冰醋酸，缝合切口，术后正常喂食和水。第二天将手术后状态良好的动物按体重随机分为模型组和受试样品三个剂量组。各剂量组按相应剂量灌胃，连续 14 天。模型组灌胃蒸馏水或溶剂。禁食 24 小时后处死，取出整个胃浸泡于 10% 的福尔马林溶液内，浸泡 20 分钟后沿胃大弯剪开，洗净内容物，取腺胃区展开平铺于玻璃板上，用纸吸干溃疡内的水分，测量其面积和体积。

溃疡面积和体积测量法：于带标尺的解剖显微镜下计数溃疡所占的方格数，换算成面积。然后用微量注射器将有色墨水注入溃疡内，将溃疡填满与周边平齐，读取微量注射器上刻度即为溃疡的体积。

1.4.3.3.2 冰醋酸浸渍法：将动物禁食不禁水 24 小时，乙醚、异氟烷、巴比妥钠或水合氯醛麻醉后实施剖腹手术，消毒腹部，于剑突下切开腹腔，将牛津杯（内径 5mm、长 10mm）垂直放置胃体部粘膜上，向管腔加入冰醋酸 0.2mL，1.5 分钟后用棉签蘸出冰醋酸，缝合手术切口，术后正常喂食和水，第二天将手术后状态良好的动物按体重随机分组、给药，动物处置和测量等操作同上。

1.5 数据处理和结果判定

数据可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性。 F 值 $\geq F_{0.05}$ ，即 $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和对照组间均数的两两比较方法进行统计。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。

受试物一个或一个以上剂量组与模型对照组比较，急性胃粘膜损伤模型大体观察评分或大体观察评分与病理组织学检查评分显著降低，慢性胃溃疡模型的溃疡面积和/或体积显著减小，表明胃粘膜损伤明显改善，可判定该受试样品动物实验结果为阳性。

1.6 注意事项

动物禁食应完全，应严格控制动物禁食期间食粪便、皮毛、垫料等。

2 人体试食试验

2.1 受试者的选择标准

2.1.1 纳入受试者标准：符合慢性浅表性胃炎诊断标准且经胃镜筛选确诊为胃粘膜损伤的自愿受试者。

2.1.2 慢性浅表性胃炎诊断标准：病程迁延，有不同程度的消化不良、上腹痛、烧心、嗝气、反酸、腹胀等临床症状，可有上腹部轻度压痛。符合慢性浅表性胃炎纤维胃镜诊断标准及活体组织检查诊断标准。排除胃溃疡患者。

2.1.3 排除受试者标准：

2.1.3.1 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上，妊娠或哺乳期妇女，过敏体质及对本样品过敏者。

2.1.3.2 继发性慢性胃炎。

2.1.3.3 合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统严重疾病，精神病患者。

2.1.3.4 经常用药、嗜酒、吸烟，4 周内参加过其它实验。

2.1.3.5 3 个月内用过已知对胃肠功能有损害的药物。

2.1.3.6 症状、体征分级为重症者。

2.1.3.7 有严重消化系统溃疡的病人。

2.1.3.8 正在服用其它治疗药物或接受其它治疗者。

2.1.3.9 未按规定服用样品，无法判断功效，或资料不全等影响功效或安全性判断者。

2.2 试验设计及服样期限

采用组间和自身两种对照设计。按受试者的症状轻重随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、病程等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.3 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，在试验期间停用其它用于慢性胃病的物品，对照组服用安慰剂。按双盲法进行试食试验。观察时间不少于 30 天，必要时可延长至 45 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.4 观察指标

2.4.1 安全性指标

2.4.1.1 一般状况：包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

2.4.1.2 血、尿、便常规检查

2.4.1.3 肝、肾功能检查

2.4.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（仅在试验开始前检查一次）

2.4.2 功效指标

2.4.2.1 症状观察

胃痛、嗝气、反酸、腹胀、食欲不振、少食等临床症状。体征观察剑突下压痛程度。按症状轻重统计积分（重症 3 分，中度 2 分，轻度 1 分），见表 4。

表 4 人体试食试验症状轻重分级表

症状	轻（1 分）	中（2 分）	重（3 分）
胃痛	轻微，持续时间短，不影响工作及休息	疼痛时间较长，每日超 4 小时，尚能忍受，但对工作及休息有一定影响	疼痛较重，持续难忍，需服药才能减轻
嗝气	偶有发作	经常发作，引及两胁不适	频繁发作，引及两胁疼痛
反酸	偶有吐酸	饮食不适即吐酸	频繁吐酸
腹胀	腹胀轻微，时作时止，在短时间内可较甚	腹胀较甚或发作频繁，在较长时间内不缓解，影响工作及休息	腹胀难忍，持续时间长，需服药才能减轻
少食	食欲较差，饭量减少 1/2 以内	饭量减少 1/2—2/3	无食欲，饭量减少 2/3 以上

2.4.2.2 胃镜检查与体征观察

剑突下压痛程度检查，根据疼痛程度分为轻（1 分）、中（2 分）、重（3 分）。

轻度：用力时才出现疼痛，压痛轻微 1 分

中度：用力即出现疼痛，但疼痛尚能忍受，压痛明显 2 分

重症：稍微用力即出现疼痛，疼痛不能忍受，压痛剧烈 3 分

随机选择试食组和对照组各 15 例受试者进行胃镜检查，比较试食试验前后的改变。

2.5 数据处理和结果判定

统计症状和体征积分值。

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验。若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验，但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

结果判定：试食前后试食组自身比较及试食后试食组与安慰剂对照组组间比较，临床症状、体征积分明显减少，胃镜复查结果有改善或不加重，可判定该受试样品具有辅助保护胃粘膜的作用。

十九、有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平 检验方法

根据血脂异常的类型，有助于维持血脂（胆固醇/甘油三酯）健康水平按照受试物作用机制的不同，设立分类的动物试验。

动物试验：分成二种情况：

1. 混合型高脂血症动物模型
2. 高胆固醇血症动物模型

人体试食试验：根据试验的结果，分三种情况分别进行判定：

1. 有助于维持血脂健康水平功能
2. 有助于维持血胆固醇健康水平功能
3. 有助于维持血甘油三酯健康水平功能

1 动物实验方法

1.1 混合型高脂血症动物模型

1.1.1 原理

用含有胆固醇、蔗糖、猪油、胆酸钠的饲料喂养动物可形成脂代谢紊乱动物模型，再给予动物受试样品，可检测受试样品对高脂血症的影响，并可判定受试样品对脂质的吸收、脂蛋白的形成、脂质的降解或排泄产生的影响。

1.1.2 仪器及试剂

解剖器械、分光光度计、自动生化分析仪、胆固醇、胆酸钠、血清总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C），高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）测定试剂盒。

1.1.3 动物选择及饲料

1.1.3.1 健康成年雄性大鼠，适应期结束时，体重 $200 \pm 20\text{g}$ ，首选 SD 大鼠，每组 8—12 只。

1.1.3.2 模型饲料

在维持饲料中添加 20.0%蔗糖、15.0%猪油、1.2%胆固醇、0.2%胆酸钠，适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等。除了粗脂肪外，模型饲料的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、钙：磷均要达到维持饲料的国家标准。

1.1.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组、空白对照组和模型对照组，以人体推荐量的5倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间为30天，必要时可延长至45天。

1.1.5 实验步骤

1.1.5.1 适应期：于屏障系统下大鼠喂饲维持饲料观察 5—7 天。

1.1.5.2 造模期

按体重随机分成 2 组，10 只大鼠给予维持饲料作为空白对照组，40 只给予模型饲料作为模型组。每周称量体重 1 次。模型组给予模型饲料 1—2 周后，空白对照组和模型组大鼠不禁食采血（眼内眦或尾部），采血后尽快分离血清，测定血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。根据 TC 水平将模型组随机分成 4 组（即一个模型对照组、三个剂量组），分组后模型组（模型对照组和三个剂量组）各组间比较 TC、TG、LDL-C、HDL-C 差异均无显著性；模型组（模型对照组和三个剂量组）各组与空白对照组比较，TC、TG、LDL-C 升高差异均有显著性，判定模型成立。

1.1.5.3 受试样品给予

分组后，三个剂量组每天经口给予受试样品，空白对照组和模型对照组同时给予同体积的相应溶剂，空白对照组继续给予维持饲料，模型对照组及三个剂量组继续给予模型饲料，并定期称量体重，于实验结束时不禁食采血，采血后尽快分离血清，测定血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。

1.1.6 观察指标：TC、TG、LDL-C、HDL-C。

1.1.7 数据处理和结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

动物实验结果判定：

有助于维持血脂健康水平（胆固醇/甘油三酯）功能结果判定：实验结束时，模型对照组和空白对照组比较，血清甘油三酯升高，血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇升高，差异均有显著性，判定模型成立。（1）各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇降低，且任一剂量组血清甘油三酯降低，差异有显著性，同时各剂量组血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血脂健康水平功能动物实验结果阳性。（2）各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇降低，差异均有显著性，同时各剂量组血清甘油三酯不显著高于模型对照组，各剂量组血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血胆固醇健康水平功能动物实验结果阳性。（3）各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清甘油三酯降低，差异有显著性，同时各剂量组血清总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇不显著高于模型对照组，血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血甘油三酯健康水平功能动物实验结果阳性。

1.1.8 注意事项

1.1.8.1 在建立动物模型中，可因动物品系、饲养管理而影响模型的建立。

1.1.8.2 保证维持饲料的各种营养成分，必要时需进行检测，除了粗脂肪外，模型饲料的水分、粗蛋白、粗纤维、粗灰分、钙、磷、钙：磷均要达到维持饲料的国家标准。

1.1.8.3 模型饲料喂养期间，模型组血中胆固醇水平比较稳定，甘油三酯水平会逐渐恢复正常水平，故模型饲料给予时间不能超过 8 周。

1.2 高胆固醇血症动物模型

1.2.1 原理

用含有胆固醇、猪油、胆酸钠的饲料喂养动物可形成高胆固醇脂代谢紊乱动物模型，再给予动物受试样品，可检测受试样品对高胆固醇血症的影响，并可判定受试样品对脂质的吸收、脂蛋白的形成、脂质的降解或排泄产生的影响。

1.2.2 仪器及试剂

解剖器械，分光光度计，自动生化分析仪，胆固醇、胆酸钠，血清总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）测定试剂盒。

1.2.3 动物选择及饲料

1.2.3.1 大鼠模型：健康成年雄性大鼠，适应期结束时，体重 $200\pm 20\text{g}$ ，首选SD大鼠，每组8—12只。

金黄地鼠模型：健康成年雄性金黄地鼠，适应期结束时，体重 $100\pm 10\text{g}$ ，每组8—12只。

1.2.3.2 模型饲料

大鼠模型：在维持饲料中添加 1.2%胆固醇、0.2%胆酸钠、3—5%猪油、适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等。除了粗脂肪外，模型饲料的其它质量指标均要达到维持饲料的国家标准。

金黄地鼠模型：在维持饲料中添加0.2%胆固醇，其余同大鼠模型。

1.2.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组、空白对照组和模型对照组，以人体推荐量的5倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间为30天，必要时可延长至45天。

1.2.5 实验步骤

1.2.5.1 适应期：于屏障系统下动物喂饲维持饲料观察 5—7 天。

1.2.5.2 造模期：

按体重随机分成 2 组，10 只动物给予维持饲料作为空白对照组，40 只给予模型饲料作为模型组。每周称量体重 1 次。

模型组给予模型饲料 1—2 周后，空白对照组和模型组大鼠不禁食采血（眼内眦或尾部），采血后尽快分离血清，测定血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。根据 TC 水平将模型组随机分成 4 组（即一个模型对照组、三个剂量组），分组后模型组（模型对照组和三个剂量组）各组间比较 TC、TG、LDL-C、HDL-C 差异均无显著性；模型组（模型对照组和三个剂量组）各组与空白对照组比较，TC、TG、LDL-C 升高差异均有显著性，判定模型成立。

1.2.5.3 受试样品给予

分组后，三个剂量组每天经口给予受试样品，空白对照组和模型对照组同时给予同体积的相应溶剂，空白对照组继续给予维持饲料，模型对照组及三个剂量组继续给予模型饲料，并定期称量体重，于实验结束时不禁食采血，采血后尽快分离血清，测定血清TC、TG、LDL-C、HDL-C水平。

1.2.6 观察指标：TC、TG、LDL-C、HDL-C。

1.2.7 数据处理和结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $<F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P\leq 0.05$ ，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；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。

动物实验结果判定：

有助于维持血胆固醇健康水平功能结果判定：模型对照组和空白对照组比较，血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇升高，差异有显著性，血清甘油三酯差异无显著性，判定模型成立。各剂量组与模型对照组比较，任一剂量组血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇降低，差异有显著性，并且各剂量组血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于模型对照组，血清甘油三酯不显著高于模型对照组，可判定该受试样品有助于维持血胆固醇健康水平功能动物实验结果阳性。

1.2.8 注意事项

1.2.8.1 在建立动物模型中，可因动物品系、饲养管理而影响模型的建立。

1.2.8.2 保证维持饲料的各种营养成分，必要时需进行检测。

2 人体试食试验方法

2.1 受试者纳入标准

2.1.1 在正常饮食情况下，检测禁食12—14小时后的血脂水平，半年内至少有两次血脂检测结果，血清总胆固醇在5.18—6.21mmol/L，并且血清甘油三酯在1.70—2.25mmol/L，可作为有助于维持血脂健康水平功能试验备选对象；血清甘油三酯在1.70—2.25mmol/L，并且血清总胆固醇 $\leq$ 6.21mmol/L，可作为有助于维持血甘油三酯健康水平功能试验备选对象；血清总胆固醇在5.18—6.21mmol/L，并且血清甘油三酯 $\leq$ 2.25mmol/L，可作为有助于维持血胆固醇健康水平功能试验备选对象，在参考动物实验结果基础上，选择相应指标者为受试对象。

2.1.2 获得知情同意书，自愿参加试验者。

2.2 排除受试者标准

2.2.1 年龄在18岁以下或65岁以上者。

2.2.2 妊娠或哺乳期妇女，过敏体质或对本受试样品过敏者。

2.2.3 合并有心、肝、肾和造血系统等严重疾病，精神病患者。

2.2.4 近两周曾服用降脂药物等，影响到对结果的判断者。

2.2.5 高脂血症患者。

2.2.6 未按规定食用受试样品，或资料不全，影响功效或安全性判断者。

2.3 受试样品的剂量和使用方法

根据受试样品推荐量和推荐方法确定。

2.4 试验设计及分组要求

采用组间对照设计。根据随机盲法的要求进行分组。按受试者血脂水平随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、饮食等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于50例。试食组服用受试样品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。试验周期45天，不超过6个月。

2.5 观察指标

2.5.1 安全性指标

2.5.1.1 一般状况（包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等）

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查

2.5.1.4 胸片、心电图、腹部B超检查（仅在试验开始前进行）

2.5.2 功效性指标

2.5.2.1 血清总胆固醇（TC）水平及降低百分率、甘油三酯（TG）水平及降低百分率、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）水平及上升幅度、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平。

2.5.2.2 功效判定标准

有效：TC 降低>10%或降至正常（<5.18mmol/L）；TG 降低>15%或降至正常（<1.70mmol/L）；HDL-C上升>0.104mmol/L。

血脂总有效：TC、TG、HDL-C三项指标均达到有效标准者。

无效：未达到有效标准者。

观察血清总胆固醇（TC）有效率、甘油三酯（TG）有效率、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）有效率及血脂总有效率。

2.6 数据处理和结果判定

凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；方差齐但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。有效率及总有效率采用 χ^2 检验进行检验。四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

2.6.1 有助于维持血脂健康水平功能结果判定

试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，受试者血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇降低，差异均有显著性，同时血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于对照组，试验组血脂总有效率显著高于对照组，可判定该受试样品有助于维持血脂健康水平功能人体试食试验结果阳性。

2.6.2 有助于维持血胆固醇健康水平功能结果判定

试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，受试者血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇降低，差异均有显著性，同时血清甘油三酯不显著高于对照组，血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于对照组，试验组血清总胆固醇有效率显著高于对照组，可判定该受试样品有助于维持血胆固醇健康水平功能人体试食试验结果阳性。

2.6.3 有助于维持血甘油三酯健康水平功能结果判定

试食组自身比较及试食组与对照组组间比较，受试者血清甘油三酯降低，差异有显著性，同时血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇不显著高于对照组，血清高密度脂蛋白胆固醇不显著低于对照组，试验组血清甘油三酯有效率显著高于对照组，可判定该受试样品有助于维持血甘油三酯健康水平功能人体试食试验结果阳性。

二十、有助于维持血糖健康水平检验方法

1 动物实验

1.1 实验动物

选用成年动物，选用小鼠（ $26 \pm 2\text{g}$ ）或大鼠（ $180 \pm 20\text{g}$ ），单一性别，每组 10—15 只。

1.2 材料

1.2.1 试剂

四氧嘧啶（ $\text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 分子量 160.08）或链脲佐菌素、地塞米松磷酸钠注射液、葡萄糖或医用淀粉、血糖测定试纸或试剂盒，胰岛素、甘油三酯、总胆固醇测定试剂盒

1.2.2 高热能饲料

猪油 10%、蔗糖 15%、蛋黄粉 15%、酪蛋白 5%、胆固醇 1.2%、胆酸钠 0.2%、碳酸氢钙 0.6%、石粉 0.4%、鼠维持饲料 52.6%

1.2.3 仪器

血糖仪、全自动生化仪、可见光分光光度计、酶标仪、天平。

1.3 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个模型对照组，以人体推荐量的 10 倍（小鼠）或 5 倍（大鼠）为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，高剂量一般不超过 30 倍，必要时设空白对照组。同时设给予受试样品高剂量的正常动物组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.4 实验方法

1.4.1 正常动物降糖实验

选健康成年动物按禁食 3—5 小时的血糖水平分组，随机选 1 个对照组和 1 个剂量组。对照组给予溶剂，剂量组给予高剂量浓度受试样品，连续 30 天，测空腹血糖值（禁食同实验前），比较两组动物血糖值。

1.4.2 高血糖模型降糖实验

方案一

1.4.2.1 胰岛损伤高血糖模型

1.4.2.1.1 原理

四氧嘧啶（或链脲佐菌素）是一种 β 细胞毒剂，可选择性地损伤多种动物的胰岛 β 细胞，造成胰岛素分泌低下，引起实验性糖尿病。

1.4.2.1.2 造模方法

购入成年动物，适应 3—5 天后，随机取 15 只动物禁食 3—5 小时，测空腹血糖，作为该批次动物基础血糖值。随后动物禁食 24 小时（自由饮水），注射四氧嘧啶（用前新鲜配制）造模，小鼠 $45\text{—}50\text{mg/kg BW.iv}$ 或 $125\text{—}130\text{mg/kg BW.ip}$ ，大鼠 $50\text{—}80\text{mg/kg BW.iv}$ 或 $120\text{—}160\text{mg/kg BW.ip}$ 。5—7 天后动物禁食 3—5 小时，测血糖，血糖值 $10\text{—}25\text{mmol/L}$ 为高血糖模型成功动物。

1.4.2.1.3 高血糖模型动物降糖实验

选高血糖模型动物按禁食 3—5 小时的血糖水平随机分组，设 1 个模型对照组和 3 个剂量组（组间差不大于 1.1mmol/L）。剂量组给予不同浓度受试样品，模型对照组给予溶剂，连续 30 天，测空腹血糖值（禁食同实验前），比较各组动物血糖值及血糖下降百分率。

$$\text{血糖下降率}\% = \frac{(\text{实验前血糖值} - \text{实验后血糖值})}{\text{实验前血糖值}} \times 100\%$$

1.4.2.1.4 高血糖模型动物糖耐量实验

剂量分组及受试样品给予时间同 1.4.2.1.3。各组动物禁食 3—5 小时，测定给葡萄糖或医用淀粉前（即 0 小时）血糖值，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，15—20 分钟后各组经口给予葡萄糖 2.0g/kg BW 或医用淀粉 3—5g/kg BW，测定给葡萄糖后各组 0.5、2 小时的血糖值或给医用淀粉后 1、2 小时的血糖值，观察模型对照组与受试样品组给葡萄糖或医用淀粉后各时间点（0、0.5、2 小时）血糖值及血糖曲线下面积的变化。

$$\text{血糖曲线下面积} = \frac{(0 \text{ 小时血糖} + 0.5 \text{ 小时血糖}) \times 0.5}{2} + \frac{(2 \text{ 小时血糖} + 0.5 \text{ 小时血糖}) \times 1.5}{2}$$

方案二

1.4.2.2 胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型(任选其一)

1.4.2.2.1 地塞米松诱导胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型

1.4.2.2.1.1 原理

糖皮质激素具有拮抗胰岛素生物效应的作用，可抑制靶组织对葡萄糖的摄取和利用，促进蛋白质和脂肪的分解及糖异生作用，导致糖、脂代谢紊乱，胰岛素抵抗，诱发实验性糖尿病。

1.4.2.2.1.2 试验方法

购入健康雄性大鼠（150±20g），普通维持料适应饲养 3—5 天，禁食 3—4 小时，取尾血，测定空腹即给葡萄糖前（0 小时）血糖值，给 2.5g/kg·BW 葡萄糖后测定 0.5、2 小时血糖值，作为该批次动物基础值。以 0、0.5 小时血糖水平分 5 个组，即 1 个空白对照组、1 个模型对照组和 3 个剂量组，每组 15 只。空白对照组不作处理，3 个剂量组灌胃给予不同浓度受试样品，模型对照组给予同体积溶剂，连续 35 天。各组给予维持饲料饲养，1 周后模型对照组和 3 个剂量组更换高热能饲料，喂饲 2 周后，模型对照组和 3 个剂量组在高热能饲料基础上分别给予地塞米松 0.8mg/kg BW 腹腔注射（0.008%地塞米松注射液 1ml/100g 体重），每日 1 次，连续 10—12 天。试验结束，各组动物禁食 3—4 小时，检测空腹血糖、糖耐量、血清胰岛素及胆固醇、甘油三脂水平。

1.4.2.2.1.3 观察指标

1.4.2.2.1.3.1 空腹血糖、糖耐量

各组动物禁食 3—4 小时，测定空腹血糖即给葡萄糖前（0 小时）血糖值，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，空白对照组不作处理，15—20 分钟后各组经口给予葡萄糖 2.5g/kg BW，测定给葡萄糖后各组 0.5、2 小时的血糖值，若模型对照组 0.5 小时血糖值≥10mmol/L，或模型对照组 0.5 小时、2 小时任一时间点血糖升高或血糖曲线下面积升高，与空白对照组比较，差异有显著性，判定模型糖代谢紊乱。

成立，在此基础上，观察模型对照组与受试样品组空腹血糖、给葡萄糖后（0.5、2 小时）血糖及 0、0.5、2 小时血糖曲线下面积的变化。

$$\text{血糖下降率}\% = \frac{(\text{实验前血糖值} - \text{实验后血糖值})}{\text{实验前血糖值}} \times 100\%$$

$$\text{血糖曲线下面积} = \frac{(\text{0 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 0.5}{2} + \frac{(\text{2 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 1.5}{2}$$

1.4.2.2.1.3.2 胆固醇、甘油三脂

各组动物禁食 3—4 小时，检测血清胆固醇、甘油三脂，若模型对照组血清胆固醇或甘油三酯明显升高，与空白对照组比较，差异有显著性，判定模型脂代谢紊乱成立，在此基础上，观察模型对照组与受试样品组血脂变化。

1.4.2.2.1.3.3 胰岛素

各组动物禁食 3—4 小时，检测血清胰岛素，模型对照组与空白对照组比较胰岛素抵抗指数无明显下降，且动物糖/脂代谢紊乱成立，判定胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型成功。观察模型对照组与受试样品组胰岛素抵抗情况。

$$\text{胰岛素抵抗指数} = \frac{\text{胰岛素}}{22.5e^{-\ln \text{血糖}}} \approx \frac{\text{血糖} \times \text{胰岛素}}{22.5}$$

1.4.2.2.2 四氧嘧啶诱导胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型

1.4.2.2.2.1 原理

高热能饲料喂饲基础上，辅以小剂量四氧嘧啶（ $\text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 分子量 160.08），造成糖/脂代谢紊乱，胰岛素抵抗，诱发实验性糖尿病。

1.4.2.2.2.2 造模方法

购入健康雄性大鼠（ $150 \pm 20\text{g}$ ），普通维持料适应饲养 3—5 天，禁食 3—4 小时，取尾血，测定给葡萄糖前（即 0 小时）血糖值，给 2.5g/kg BW 葡萄糖后 0.5、2 小时血糖值，作为该批次动物基础值。以 0、0.5 小时血糖水平分 5 个组，即 1 个空白对照组、1 个模型对照组和 3 个剂量组，每组 15 只。空白对照组不作处理，3 个剂量组灌胃给予不同浓度受试样品，模型对照组给予同体积溶剂，连续 33 天。各组给予维持料饲养 1 周后模型对照组和 3 个剂量组更换高热能饲料，喂饲 3 周后，模型对照组和 3 个剂量禁食 24 小时（不禁水），给予四氧嘧啶 $103-105\text{mg/kg BW}$ 腹腔注射，注射量 $1\text{ml}/100\text{g}$ 体重。注射后继续给予高热能饲料喂饲 3—5 天。试验结束，各组动物禁食 3—4 小时，检测空腹血糖、糖耐量、血清胰岛素及胆固醇、甘油三脂水平。

1.4.2.2.2.3 观察指标

1.4.2.2.2.3.1 空腹血糖、糖耐量

各组动物禁食 3—4 小时，测定空腹血糖即给葡萄糖前（0 小时）血糖值，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，空白对照组不作处理，15—20 分钟后各组经口给予葡萄糖 2.5g/kg BW ，测定给葡萄糖后各组 0.5、2 小时的血糖值，若模型对照组 0.5 小时血糖值 $\geq 10\text{mmol/L}$ ，或模型对照组 0.5 小时、2 小时任一时间点血糖升高或血糖曲线下面积升高，与空白对照组比较，差异有显著性，判定模型糖代谢紊乱

成立，在此基础上，观察模型对照组与受试样品组空腹血糖、给葡萄糖后（0.5、2 小时）血糖及 0、0.5、2 小时血糖曲线下面积的变化。

$$\text{血糖下降率}\% = \frac{(\text{实验前血糖值} - \text{实验后血糖值})}{\text{实验前血糖值}} \times 100\%$$

$$\text{血糖曲线下面积} = \frac{(\text{0 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 0.5}{2} + \frac{(\text{2 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 1.5}{2}$$

1.4.2.2.3.2 胆固醇、甘油三脂

各组动物禁食 3—4 小时，检测血清胆固醇、甘油三脂，若模型对照组血清胆固醇或甘油三酯明显升高，与空白对照组比较，差异有显著性，判定模型脂代谢紊乱成立，在此基础上，观察模型对照组与受试样品组血脂变化。

1.4.2.2.3.3 胰岛素

各组动物禁食 3—4 小时，检测血清胰岛素，模型对照组与空白对照组比较胰岛素抵抗指数无明显下降，且动物糖/脂代谢紊乱成立，判定胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型成功。观察模型对照组与受试样品组胰岛素抵抗情况。

$$\text{胰岛素抵抗指数} = \text{胰岛素} / 22.5e^{-\ln \text{血糖}} \approx \frac{\text{血糖} \times \text{胰岛素}}{22.5}$$

1.5 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

1.5.1 指标判定

1.5.1.1 正常动物降糖试验

血糖指标：空腹血糖受试样品剂量组与对照组比较无统计学意义，判定对正常动物血糖无影响。

1.5.1.2 高血糖模型降糖试验

空腹血糖指标：模型成立的前提下，受试样品剂量组与模型对照组比较，空腹血糖下降或血糖下降百分率升高有统计学意义，判定该受试样品空腹血糖指标结果阳性。

糖耐量指标：模型成立的前提下，受试样品剂量组与模型对照组比较，在给葡萄糖或医用淀粉后 0.5、2 小时任一时间点血糖下降（或血糖下降百分率升高）有统计学意义，或 0、0.5、2 小时血糖曲线下面积降低有统计学意义，判定该受试样品糖耐量指标结果阳性。

血脂指标：模型成立的前提下，受试样品剂量组与模型对照组比较，血清胆固醇或甘油三酯下降有统计学意义，可判定该受试样品降血脂指标阳性。

1.5.2 结果判定

方案一：空腹血糖和糖耐量二项指标中一项指标阳性，且对正常动物空腹血糖无影响，即可判定该受试样品有助于维持血糖健康水平动物实验结果阳性。

方案二：空腹血糖和糖耐量二项指标中一项指标阳性，且血脂（总胆固醇、甘油三酯）无明显升高，对正常动物空腹血糖无影响，即可判定该受试样品有助于维持血糖健康水平动物实验结果阳性。

1.6 注意事项

1.6.1 为了使实验动物糖代谢功能状态尽量保持一致，也为了准确地按体重计算受试样品的用量，实验前动物应严格禁食 16h（不禁水），实验前后禁食条件应一致，鼠类在禁食的同时应更换衬垫物。

1.6.2 如用血清样品进行测定，应于取血后 30 分钟内分离血清，分离后血清的含糖量在 6 小时内不变。用血清制备的无蛋白血滤液可保存 48 小时以上。

1.6.3 高浓度的还原性物质如 Vit C 亦能与色素原竞争游离氧，干扰反应，使结果偏低。

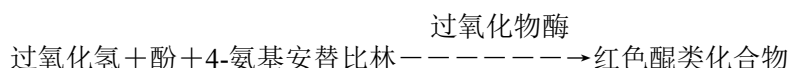
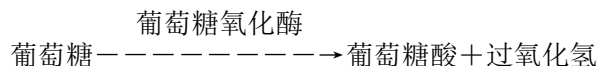
1.6.4 血红蛋白能使过氧化氢过早分解，亦干扰反应，致使测得血糖值偏低。故对已溶血的全血或血清必须制备无蛋白滤液后，再进行测定。

1.7 血糖测定方法

用试纸或试剂盒，按说明书操作；若自行配制试剂，按下列方法操作：

1.7.1 原理

葡萄糖氧化酶是一种需氧脱氢酶，能催化葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢，后者在过氧化物酶作用下放出氧，使 4-氨基安替比林与酚氧化缩合，生成红色醌类化合物，可在波长 505nm 比色测定。



1.7.2 试剂配制

磷酸盐缓冲液（0.2mol/L，pH7.0）：0.2mol/L Na₂HPO₄61mL，0.2mol/L KH₂PO₄39mL 混合即可。

酶试剂：葡萄糖氧化酶 400u，过氧化物酶 0.6mg，4-氨基安替比林 10mg，叠氮钠 100mg，加磷酸盐缓冲液至 100mL，pH 调至 7。冰箱存放至少可稳定 2 个月。

酚试剂：酚 100mg 溶于 100mL 蒸馏水中。

酶混合试剂：取等量酶试剂和酚试剂混合。在冰箱中可存放 1 个月。

葡萄糖标准液储存液：无水 D-葡萄糖（A.R.）在烤箱中 80℃ 烤 4 小时，冷却后，存放于干燥器中至恒重。精确称取 2g 以 0.25% 苯甲酸溶液溶解并移入 100mL 容量瓶中，再用苯甲酸溶液稀释至 100mL。

应用液：在 100mL 容量瓶中准确加入储存液 5mL，再用 0.25% 苯甲酸溶液稀释至 100mL，即 1mg/mL 应用液。

蛋白沉淀剂：溶解磷酸氢二钠 10g、钨酸钠 10g、氯化钠 9g 于 800mL 蒸馏水中，加入 1mol/L 盐酸 125mL，并用蒸馏水稀释至 1000mL。

1.7.3 操作步骤

取蛋白沉淀剂 1mL 加入血浆（血清）50μL 混匀。室温放置 7 分钟后，离心，取上清液（无蛋白血滤液）测定。葡萄糖标准应用液亦进行同样处理。

	测定管	标准管	空白管
无蛋白血滤液 mL	0.5	-	-
处理后的葡萄糖标准液 mL	-	0.5	-
蛋白沉淀液 mL	-	-	0.5
酶混合试剂 mL	4	4	4

混匀后，37℃水浴保温 15 分钟，用空白管调零点，在波长 505nm 处比色。

1.7.4 结果计算

$$\text{血糖含量 (mmol/L)} = \frac{\text{测定管 OD}}{\text{标准管 OD}} \times 100/18$$

2 人体试食试验

2.1 试验设计

试验采用随机分组，组间对照设计。

2.2 受试产品

受试产品必须是具有定型包装、标明服用方法和服用量的定型产品；安慰剂除功效成分外，在剂型、口感、外观和包装上与受试产品保持一致。

2.3 受试者选择

2.3.1 纳入标准

选择空腹血糖 5.6—7mmol/L（100—126mg/dL）或餐后 2 小时血糖 7.8—11.1mmol/L（140—200mg/dL）的糖调节受损（IGR）人群。

2.3.2 排除标准

2.3.2.1 糖尿病病人。

2.3.2.2 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上，妊娠或哺乳期妇女，对受试样品过敏者。

2.3.2.3 有心、肝、肾等主要脏器并发症，或合并有其它严重疾病，精神病患者，服用糖皮质激素或其它影响血糖药物者。

2.3.2.4 不能配合饮食控制而影响观察结果者。

2.3.2.5 近 3 个月内有糖尿病酮症、酸中毒以及感染者。

2.3.2.6 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。

2.3.2.7 凡不符合纳入标准，未按规定服用受试样品，或资料不全影响观察结果者。

2.4 受试者分组

采用组间对照设计。根据随机盲法的要求进行分组。接受试者的糖化血红蛋白或糖化血清蛋白及血糖水平随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.5 试验方法

试验前对每一位受试者按性别、年龄、不同劳动强度、理想体重参照原来生活习惯规定相应的饮食，试食期间坚持饮食控制，治疗糖尿病的药物种类和剂量不变。试食组在服药的基础上，按推荐服用方法和服用量每日服用受试样品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 2 个月，必要时可延长至 4 个月。

2.6 观察指标

2.6.1 安全性指标

2.6.1.1 一般状况体征 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

2.6.1.2 血、尿、便常规检查

2.6.1.3 肝、肾功能检查

2.6.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（仅试验前检查一次）

2.6.2 功效指标

2.6.2.1 症状观察

详细询问病史，了解患者饮食情况、用药情况、活动量，观察口渴多饮、多食易饥、倦怠乏力、多尿等主要临床症状，按症状轻重积分，于试食前后统计积分值，并就其主要症状改善（改善 1 分为有效），观察临床症状改善率。

临床症状积分表

	无症状 (积 0 分)	轻症 (积 1 分)	中症 (积 2 分)	重症 (积 3 分)
口渴多饮	无	有口渴感，饮水量 <1 L/日	口渴感明显，饮水量 1—2 L/日	口渴显著，饮水量 >2L/日
多食易饥	无	餐前有轻度饥饿感	餐前有明显饥饿感	昼夜均有饥饿感
多尿	尿量<1.8L/日	尿量 1.8—2.5 L/日	尿量 2.5—3 L/日	尿量>3 L/日
倦怠乏力	无	精神不振，不耐劳力	精神疲乏，可坚持轻体力劳动	精神极度疲乏，勉强坚持日常活动

2.6.2.2 空腹血糖

观察试食前后空腹血糖值、空腹血糖下降百分率、空腹血糖有效率。

2.6.2.3 餐后 2 小时血糖

观察试食前后食用 100g 精粉馒头后 2 小时血糖值、餐后 2 小时血糖下降百分率、餐后 2 小时血糖有效率。

2.6.2.4 糖化血红蛋白或糖化血清蛋白

观察试食前后糖化血红蛋白或糖化血清蛋白变化。

2.6.2.5 血脂

观察试食前后血清总胆固醇、血清甘油三酯水平。

2.7 注意

2.7.1 血清(浆)中的葡萄糖能与白蛋白及其他血清蛋白分子末端的氨基上发生非酶促糖化反应而形成高分子酮胺结构。此酮胺结构能在碱性环境中与硝基四氮唑兰(NBT)发生还原反应生成蓝紫色物质，以1-脱氧-1-吗啡啉果糖(DMF)作标准参照物在540nm波长处(530nm—550nm)进行比色测定，求得样本中果糖胺的浓度。参考值为1.7mmol/L—2.5mmol/L。由于血清中白蛋白的半衰期约21d，所以糖化血清蛋白测定可反映患者过去2—3周平均血糖水平。糖尿病患者的糖化血清蛋白的增加比糖化血红蛋白迅速，当血糖得到较好控制时，糖化血清蛋白的下降也比糖化血红蛋白迅速，因此能较早地提供血糖控制信息。糖化血清蛋白更能灵敏地反映近期糖尿病患者血糖的波动情况。它的敏感度高，特异性强。并不受年龄，饮食，药物，妊娠等因素的影响，对血糖浓度的临时波动反应不敏感，是诊断糖尿病和较长时间血糖控制水平研究的良好指标。标本溶血对糖化血清蛋白的测定结果有较大影响，血清中1 g/L的血红蛋白可导致GSP测定结果增高0.6 mmol/L左右。

2.7.2 糖化血红蛋白是经过缓慢的、不可逆的、非酶促反应而结合形成的产物，其浓度与红细胞寿命(平均 120 天)和该时期内血糖平均浓度有关，不受每天葡萄糖波动的影响，也不受运动或食物的影响，可反映患者抽血前 2 个月—3 个月的平均血糖水平，是判断糖尿病长期控制的良好指标。糖化血红蛋白在健康人体内的波动范围很小(0.1%—0.2%)，正常值为 4%—6%。

2.8 数据处理和结果判定

凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；方差齐但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。

2.8.1 血糖下降幅度

$$\text{空腹血糖下降百分率} = \frac{\text{试验前空腹血糖} - \text{试验后空腹血糖}}{\text{试验前空腹血糖}} \times 100\%$$

$$\text{餐后 2 小时血糖下降百分率} = \frac{\text{试验前餐后 2 小时血糖} - \text{试验后餐后 2 小时血糖}}{\text{试验前餐后 2 小时血糖}} \times 100\%$$

2.8.2 糖化血红蛋白或糖化血清蛋白下降幅度

$$\text{糖化血红蛋白下降百分率} = \frac{\text{试验前糖化血红蛋白} - \text{试验后糖化血红蛋白}}{\text{试验前糖化血红蛋白}} \times 100\%$$

$$\text{糖化血清蛋白下降百分率} = \frac{\text{试验前糖化血清蛋白} - \text{试验后糖化血清蛋白}}{\text{试验前糖化血清蛋白}} \times 100\%$$

2.8.3 功效判定标准

有效：(1)试验后空腹血糖恢复正常 ($\leq 5.6 \text{ mmol/L}$)，或空腹血糖下降幅度 $\geq 10\%$

(2)试验后餐后 2 小时血糖恢复正常 ($\leq 7.8 \text{ mmol/L}$)，或餐后 2 小时血糖下降幅度 $\geq 10\%$

无效：未达到有效标准

$$\text{空腹血糖下降有效率} = \frac{\text{空腹血糖有效例数}}{\text{空腹血糖观察例数}} \times 100\%$$

$$\text{餐后 2 小时血糖下降有效率} = \frac{\text{餐后 2 小时血糖有效例数}}{\text{餐后 2 小时血糖观察例数}} \times 100\%$$

2.8.4 指标判定

2.8.4.1 空腹血糖：

①试验前后自身比较，空腹血糖下降差异有显著性，且试验后平均血糖恢复正常或下降幅度 $\geq 10\%$ ；②试验后试食组空腹血糖值下降或空腹血糖下降幅度高于对照组，差异有显著性；③试验后试食组空腹血糖下降有效率高于对照组，差异有显著性。满足上述 3 个条件，可判定该受试样品空腹血糖指标结果阳性。

2.8.4.2 餐后 2 小时血糖：

①试验前后自身比较，餐后 2 小时血糖下降差异有显著性，且试验后平均血糖恢复正常或下降幅度 $\geq 10\%$ ；②试验后试食组餐后 2 小时血糖值下降或餐后 2 小时血糖下降幅度高于对照组，差异有显著性；③试验后试食组餐后 2 小时血糖下降有效率高于对照组，差异有显著性。满足上述 3 个条件，可判定该受试样品餐后 2 小时血糖指标结果阳性。

2.8.4.3 糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）：

①试验前后自身比较，糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）下降差异有显著性；②试验后试食组糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）值下降或糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）下降幅度高于对照组，差异有显著性。满足上述 2 个条件，可判定该受试样品糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）指标结果阳性。

2.8.4.4 血清胆固醇：

①试验前后自身比较，血清胆固醇下降差异有显著性；②试验后试食组血清胆固醇下降与对照组比较，差异有显著性。满足上述 2 个条件，可判定该受试样品血清胆固醇指标结果阳性。

2.8.4.5 血清甘油三酯：

①试验前后自身比较，血清甘油三酯下降差异有显著性；②试验后试食组血清甘油三酯下降与对照组比较，差异有显著性。满足上述 2 个条件，可判定该受试样品血清甘油三酯指标结果阳性。

2.8.5 结果判定

空腹血糖、餐后 2 小时血糖、糖化血红蛋白（或糖化血清蛋白）、血脂四项指标均无明显升高，且空腹血糖、餐后 2 小时血糖两项指标中一项指标阳性，对机体健康无不利影响，可判定该受试样品具有有助于维

持血糖健康水平的作用。

二十一、有助于维持血压健康水平检验方法

1 动物实验

1.1 实验原理

以受试样品给予自发高血压大鼠动物模型或通过实验方法造成的高血压动物模型，观察受试样品对高血压动物模型的血压、心率等指标的影响，评价受试样品的降血压作用。

1.2 测定方法

血压、心率的测定采用间接测压法，仪器的测压原理一般为尾脉搏法。

1.3 实验内容

1.3.1 试验项目

1.3.1.1 一般情况观察：体重，生长状况

1.3.1.2 血压、心率

1.3.2 实验动物

推荐用大鼠，首选自发高血压大鼠（SHR），SHR 宜选用 10—12 周龄，体重 180—220 克，雌雄可以兼用，其次为肾血管型高血压大鼠。每组 8—12 只。正常动物选择 Wistar、SD 大鼠等。

1.3.3 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 5 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，同时设给予受试样品高剂量的正常动物组。必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.4 实验方法

1.4.1 肾血管型高血压大鼠模型制备

肾血管型高血压大鼠需手术制备，常用两肾一夹型。术中选用内径为 0.20—0.25mm 的银夹，放置于左肾动脉尽量靠近主动脉处。30 天后，选用血压 $\geq 21.3\text{kPa}$ （160mmHg）且较稳定者，也可根据情况选用血压较术前升高 4KPa 者。

1.4.2 血压、心率测定的具体方法

实验前一周对受试动物进行多次血压测量，使其适应测压环境。依据测压仪器的要求进行动物清醒、安静状态下的血压、心率的测定。实验开始后每周测压 1—2 次。停止给予受试样品之后，一般继续观察直至血压恢复至对照组水平或继续观察 7—14 天。

1.4.3 正常动物

选健康成年动物按 1.4.2 测定血压、心率。

1.5 数据处理和结果判定

血压测定为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $<F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定：实验组动物血压明显低于对照组，差异具有显著性，且对实验组动物心率和正常动物的血压及心率无影响，可判定该受试样品有助于维持血压健康水平动物实验结果阳性。

1.6 注意事项

1.6.1 测定动物血压时室温应保持在 25℃。以尾动脉间接测压法测定大鼠血压时，需要给大鼠保温，应注明恒温盒温度及保温时间。各次血压测定过程中温度条件保持一致。

1.6.2 操作应轻柔，减少动物的应激反应，大鼠放入固定笼中待大鼠安静后才可进行测量，大鼠如在测定中出现烦躁、啃咬等应激反应，应重新测量。

1.6.3 推荐使用无创性小动物血压测定仪器。鼠尾套袖应放置于鼠尾的根部，选用松紧适当的套袖。套袖以约 20—30mmHg/s 的速度充气加压至脉搏波消失之后约 20mmHg 处。每次测量间隔一定时间，记录心率变化 $\leq$ 10 次/分、血压变化 $\leq$ 6mmHg 的连续三次读数，取其均数。

1.6.4 动物的饲养环境保持安静，排除环境因素对血压的影响。

2 人体试食试验

2.1 受试对象纳入标准

血压处于正常范围的偏高区间（正常高值血压），收缩压 120~139mmHg 和/或舒张压 80~89mmHg 者，满足两者任一项即可纳入。

2.2 排除者标准：

2.2.1 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上、高血压症患者、妊娠或哺乳妇女、对受试样品过敏者。

2.2.2 合并有肝、肾和造血系统等严重全身性疾病患者。

2.2.3 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。

2.2.4 未按照规定服用受试样品，无法判断功效或因资料不全等影响功效判断者。

2.3 试验设计及分组要求：采用组间对照设计。按受试者的血压水平随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4.受试样品的剂量和使用方法：受试者在试食观察期间，试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

2.5 观察指标

各项指标于试验开始及结束时各测定一次，其中血压每周测量一次。

2.5.1 安全性指标

2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便等

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查

2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（各项指标在试验前测定一次）

2.5.2 功效性指标

2.5.2.1 一般情况

详细询问病史，了解受试者饮食情况、活动量。观察主要症状：头痛、眩晕、心悸、耳鸣、失眠、烦躁、腰膝酸软等。

2.5.2.2 血压、心率测量：每周定时定人测量血压、心率一次，测量前受试者休息 15—20 分钟。

2.6 数据处理和结果判定

功效判定：

有效：达到以下任何一项者。

舒张压下降 $\geq 10\text{mmHg}$ 或降至正常 ($<80\text{mmHg}$)

收缩压下降 $\geq 20\text{mmHg}$ 或降至正常 ($<120\text{mmHg}$)

无效：未达到以上标准者

按症状轻重（重症 3 分、中症 2 分、轻症 1 分）统计试食前后积分值和计算改善率（症状改善 1 分及 1 分以上为有效）。

血压测定数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料应用秩和检验。在试验前组间比较差异无显著性的前提下，可进行试验后组间比较。

改善率为计数资料，用 χ^2 检验。四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

结果判定

试食前后试食组自身比较，舒张压或收缩压测定值明显下降，差异有显著性，且舒张压下降 $\geq 10\text{mmHg}$ 或降至正常，或收缩压下降 $\geq 20\text{mmHg}$ 或降至正常，试食后试食组与对照组组间比较，舒张压或收缩压测定值或其下降百分率差异有显著性，可判定该受试样品具有有助于维持血压健康水平的作用。

二十二、对化学性肝损伤有辅助保护作用检验方法

1 方案一：四氯化碳肝损伤模型

1.1 原理

四氯化碳(CCl_4)受到肝微粒体酶活化成为三氯甲烷自由基($\text{CCl}_3\cdot$)与蛋白质共价结合导致蛋白合成障碍、脂质分解代谢紊乱,引起肝细胞内甘油三酯(TG)蓄积。 $\text{CCl}_3\cdot$ 也能迅速与 O_2 结合转化为过氧化三氯甲烷自由基($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$)导致脂质过氧化,从而引起细胞膜的变性损伤,致使酶渗漏以及各种类型的细胞病变,甚至坏死。

1.2 实验动物

成年大鼠或小鼠,单一性别,大鼠(180—220克),每组8—12只,小鼠(18—22克),每组10—15只。

1.3 实验方法和步骤

1.3.1 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组、一个空白对照组和一个模型对照组,以人体推荐量的10倍(小鼠)或5倍(大鼠)为其中的一个剂量组,另设两个剂量组。用 CCl_4 (分析纯)造成肝损伤模型,造模方式可以灌胃或腹腔注射。小鼠 CCl_4 灌胃浓度为1%,以食用植物油稀释,灌胃量5mL/kg BW(折合 CCl_4 的剂量为80 mg/kg·BW),大鼠 CCl_4 灌胃浓度为2—3%,灌胃量5mL/kg BW(折合 CCl_4 的剂量为160—240 mg/kg BW)。必要时设阳性对照组和溶剂对照组。受试样品给予时间30天,必要时可延长至45天。

1.3.2 给予受试样品的途径

经口灌胃给予受试样品,无法灌胃时将受试样品掺入饲料或饮水亦可,并记录每只动物的饲料摄入量或饮水量。

1.3.3 实验步骤

受试组每日经口灌胃给予受试样品,空白对照组和模型对照组给予蒸馏水。将动物每周称重两次,以调整受试样品剂量。于实验第30天将各组动物隔夜禁食16小时,模型组及各样品组一次灌胃给予 CCl_4 ,空白对照组给食用植物油,受试组继续给予受试样品至实验结束(与 CCl_4 灌胃间隔4小时以上)。给予 CCl_4 后,根据实际情况于24或48小时处死动物,取血分离血清,测定ALT、AST,并取肝脏进行病理组织学检测。

1.3.4 检测指标

血清谷丙转氨酶(ALT),谷草转氨酶(AST),肝脏病理组织学检查

1.4 血清谷丙转氨酶(ALT),谷草转氨酶(AST)的测定

1.4.1 测定方法:可选用全自动生化分析仪或赖氏法(试剂盒)测定。

1.4.2 数据处理和结果判定

采用方差分析,但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验,方差齐,计算 F 值, F 值 $<F_{0.05}$,结论:各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$,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;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。

受试样品组的 ALT、AST 与模型对照组比较, 差异有显著性, 可分别判定 ALT、AST 结果阳性。

1.5 肝脏病理组织学变化、诊断标准和结果判定

1.5.1 实验材料: 取大鼠肝脏左叶用 10%福尔马林固定, 从肝左叶中部做横切面取材, 常规病理制片 (石蜡包埋, H.E.染色)。

1.5.2 镜检: 用 40 倍物镜观察整个组织切片并记录组织的病理变化。可见小叶中心性肝细胞的退行性病变和少数细胞坏死。主要病变类型有肝细胞气球样变、脂肪变性、胞浆凝聚、肝细胞水样变性和细胞坏死等。

1.5.3 评分标准:

分别记录每个视野中的各种病变所占视野的面积, 并累计所观察视野的病变总分。

肝细胞气球样变: (细胞肿大, 胞浆残留少许。)

大致正常	0 分
气球样变的肝细胞占整个视野的 1/4	1 分
气球样变的肝细胞占整个视野的 1/2	2 分
气球样变的肝细胞占整个视野的 3/4	3 分
气球样变的肝细胞占整个视野	4 分

肝细胞脂肪变性: (肝细胞胞浆内出现界限清晰的脂滴空泡。)

大致正常	0 分
脂肪变性的肝细胞占整个视野的 1/4	1 分
脂肪变性的肝细胞占整个视野的 1/2	2 分
脂肪变性的肝细胞占整个视野的 3/4	3 分
脂肪变性的肝细胞占整个视野	4 分

胞浆凝聚: (胞浆嗜伊红增强)

大致正常	0 分
胞浆凝聚的肝细胞占整个视野的 1/4	1 分
胞浆凝聚的肝细胞占整个视野的 2/4	2 分
胞浆凝聚的肝细胞占整个视野的 3/4	3 分
胞浆凝聚的肝细胞弥漫存在占整个视野	4 分

水样变性:

未见水样变性的肝细胞	0 分
水样变性的肝细胞占整个视野的 1/4	1 分
水样变性的肝细胞占整个视野的 2/4	2 分
水样变性的肝细胞占整个视野的 3/4	3 分
水样变性的肝细胞弥漫性存在占整个视野	4 分

肝细胞坏死: (胞浆嗜伊红变, 凝固性坏死)

未见坏死细胞	0 分
散在个别细胞占整个视野的 1/4	1 分
坏死细胞占整个视野的 2/4	2 分
坏死细胞占整个视野的 3/4	3 分
坏死细胞弥漫性存在占整个视野	4 分

1.5.4 数据处理和病理结果判定

采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

1.5.4.1 受试样品任何一个剂量组与模型对照组之间，气球样变、脂肪变性、胞浆凝聚、水样变性或肝细胞坏死等肝细胞病变中，肝细胞坏死程度减轻，差异有显著性，而其它病变类型与模型对照组比较明显减轻或无明显差异，可判断动物实验病理结果阳性。

1.5.4.2 受试样品任何一个剂量组与模型对照组之间，气球样变、脂肪变性、胞浆凝聚、水样变性这四种肝细胞病变类型加重和减轻同时存在，差异有显著性，且肝细胞坏死程度减轻，差异有显著性，则可将其各种病理变化的得分相加，肝细胞坏死评分 2 倍计入，以总分进行统计分析，若差异有显著性，可判断动物实验病理结果阳性。

1.6 结果判断

在模型成立的前提下，ALT、AST 两项血液生化指标中任何一项和病理结果为阳性，可判定该受试样品具有对化学性肝损伤有辅助保护作用功能作用。

2 方案二：酒精肝损伤模型

2.1 原理

机体大量摄入乙醇后，在乙醇脱氢酶的催化下大量脱氢氧化，使三羧循环障碍和脂肪酸氧化减弱而影响脂肪代谢，致使脂肪在肝细胞内沉积。同时乙醇能激活氧分子，产生氧自由基导致肝细胞膜的脂质过氧化及体内还原型谷胱甘肽的耗竭。

2.2 实验动物

成年小鼠或大鼠，单一性别，大鼠（180—220 克），每组 8—12 只，小鼠（18—22 克），每组 10—15 只。

2.3 实验方法和步骤

2.3.1 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个空白对照组和一个模型对照组，以人体推荐量的 10 倍（小鼠）或 5 倍（大鼠）为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。用无水乙醇（分析纯）造成肝损伤模型，无水乙醇浓度为 50%（以蒸馏水稀释），小鼠灌胃量 12—14 mL/kg BW（折合乙醇的剂量为 6000—7000 mg/kg BW）。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

2.3.2 给予受试样品的途径

经口灌胃给予受试样品，无法灌胃时将受试样品掺入饲料或饮水亦可，并记录每只动物的饲料摄入量或饮水量。

2.3.3 实验步骤

每日经口灌胃给予受试样品，空白对照组和模型对照组给予蒸馏水。动物每周称重两次，按体重调整受试样品剂量。给予受试样品结束时将模型对照组及各样品组一次灌胃给予 50%乙醇 12mL/kg BW，空白对照组给蒸馏水，禁食 16 小时处死动物，进行各项指标的检测及病理组织学检查。

2.3.4 检测指标

肝组织中丙二醛（MDA） 还原型谷胱甘肽（GSH）
甘油三酯（TG）的含量。

2.4 肝匀浆中过氧化脂质降解产物丙二醛（MDA）测定方法

2.4.1 原理

MDA（malondialdehyde）是细胞膜脂质过氧化的终产物之一，检测其含量可间接估计脂质过氧化的程度。MDA 与硫代巴比妥酸在酸性条件下共热，形成粉红色复合物，吸收峰在 535nm，据此可测得 MDA 的含量。

2.4.2 仪器与试剂

仪器 721 分光光度计、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管、组织匀浆器

试剂 0.2M 乙酸盐缓冲液 pH3.5

0.2M 乙酸溶液 185mL

0.2M 乙酸钠溶液 15mL

1mmol/L 四乙氧基丙烷（贮备液，4℃保存 3 个月），临用前用水稀释成 40nmol/mL

8.1%十二烷基硫酸钠 SDS

0.8%硫代巴比妥酸 TBA

0.2M 磷酸盐缓冲液 pH7.4

0.2M 磷酸氢二钠 1920mL

0.2M 磷酸二氢钾 480mL

2.4.3 实验步骤

2.4.3.1 样品制备

组织匀浆样品：取一定量的所需脏器，生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎，置匀浆器中，加入 0.2M 磷酸盐缓冲液，以 20000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复进行 3 次，制成 5%组织匀浆（W/V），3000r/min 离心 5~10min，取上清液待测。

2.4.3.2 样品测定

试剂	空白管	样品管	标准管
5%组织匀浆		0.1mL	
40nmol/mL 四乙氧基丙烷			0.1mL
8.1%SDS	0.2mL	0.2mL	0.2mL
0.2M 乙酸盐缓冲液	1.5mL	1.5mL	1.5mL

0.8%TBA	1.5mL	1.5mL	1.5mL
H ₂ O	0.8mL	0.7mL	0.7mL

混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却，于 532nm 比色

2.4.3.3 计算

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mg 组织)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 40 \times \frac{1}{0.05 \times 1000}$$

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/100mg 蛋白质)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 40 \times \frac{1}{0.05} \times \frac{1}{\text{每克组织蛋白(mg)}} \times 100$$

A: 空白管吸光度

B: 样品管吸光度

F: 四乙氧基丙烷吸光度

C: 四乙氧基丙烷浓度 (40nmol/mL)

K: 稀释倍数

2.4.3.4 数据处理及结果判定

数据采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

在模型成立的前提下，受试样品组的 MDA 含量与模型对照组比较，差异有显著性，判定该指标结果阳性。

2.5 肝匀浆还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定方法

2.5.1 原理

GSH 和 5,5'-二硫对硝基甲酸 (DTNB) 反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色的 5-硫代 2-硝基甲酸阴离子，于 423nm 波长有最大吸收峰，测定该离子浓度，即可计算 GSH 的含量。

2.5.2 试剂

2.5.2.1 0.9%生理盐水

2.5.2.2 4%磺基水杨酸溶液

2.5.2.3 1mol/L PBS 溶液 (pH=8.0):

Na₂HPO₄ 13.452g

KH₂PO₄ 0.722g

加蒸馏水至 1000mL。

2.5.2.4 0.004%DTNB 溶液：称取 DTNB 40mg 溶于 1000mL 的 0.1mol/L PBS 溶液 (pH=8.0) 中。

2.5.2.5 叠氮钠缓冲液

NaN ₃	16.25 mg
EDTA-Na ₂	7.44 mg
Na ₂ HPO ₄	1.732 g
NaH ₂ PO ₄	1.076 g

加蒸馏水至 1000mL，用少量 HCl、NaOH 调 pH7.0，4℃ 保存。

2.5.2.6 标准溶液：称取还原型 GSH 15.4mg，加叠氮钠缓冲液至 50mL，终浓度为 1mmol/L，临用前配制。

2.5.3 方法

2.5.3.1 样品测定：取肝脏 0.5g 加生理盐水 5mL 充分研磨成细浆（10%肝匀浆），混匀后取浆液 0.5mL 加 4% 磺基水杨酸 0.5mL 混匀，室温下 3000rpm 离心 10 分钟，取上清液即为样品。

	测定管	空白管
样品	0.5mL	—
4%磺基水杨酸	—	0.5mL
DTNB	4.5mL	4.5mL

混匀，室温放置 10 分钟后，412nm 处测定吸光度。

2.5.3.2 标准曲线

	1	2	3	4	5	6
1mmol/L GSH (mL)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
生理盐水 (mL)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25
DTNB (mL)	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
GSH 量 (μmol/L)	0	100	200	300	400	500

2.5.3.3 计算

样品 GSH 含量 (μmol/g 肝组织) = 对应曲线浓度值 (μmol/L) ÷ 50g/L

2.5.4 数据处理和结果判定

数据采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

在模型成立的前提下，受试样品组的还原型 GSH 含量与模型对照组比较，差异有显著性，判定该指标结果阳性。

2.6 肝匀浆中甘油三酯 (TG) 测定方法

2.6.1 测定方法：采用甘油三酯测定试剂盒（甘油磷酸氧化酶过氧化物酶法）测定 10%肝匀浆中的甘油三酯含量。与血清甘油三酯测定方法相同，以等量 10%肝匀浆替代血清按操作说明书进行操作，测定结果以 mmol/g

肝重表示。

2.6.2 数据处理和结果判定

数据采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

在模型成立的前提下，受试样品组的 TG 与模型对照组比较，差异有显著性，判定该指标结果阳性。

2.7 肝脏病理组织学变化、诊断标准和结果判定

2.7.1 实验材料：从肝左叶中部做横切面取材，冰冻切片，苏丹III染色或油红 O 染色。

2.7.2 镜检：从肝脏的一端视野开始记录细胞的病理变化，用 40 倍物镜连续观察整个组织切片。主要观察脂滴在肝脏的分布、范围和面积。

2.7.3 评分标准

肝细胞内脂滴散在，稀少。	0 分
含脂滴的肝细胞不超过 1/4	1 分
含脂滴的肝细胞不超过 1/2	2 分
含脂滴的肝细胞不超过 3/4	3 分
肝组织几乎被脂滴代替	4 分

2.7.4 数据处理和结果判定

采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

结果判定

在模型成立的前提下，模型对照组与受试样品任何一个剂量组之间，脂肪变性减轻，有统计学上的差异，可判断为阳性结果。

2.8 结果判定：满足任一条件，可判定受试样品具有对酒精性肝损伤有辅助保护作用。

2.8.1 肝脏 MDA、还原型 GSH 和 TG 三项检测指标结果阳性。

2.8.2 肝脏 MDA、还原型 GSH 和 TG 三项指标中任两项指标阳性和病理组织学检查结果阳性。

二十三、对电离辐射危害有辅助保护作用检验方法

1 外周血白细胞计数实验

1.1 原理

外周血白细胞数减少是一次性全身 γ 射线照射引起辐射损伤的表现之一，在一定范围内，照射剂量与外周血中白细胞数成反比，恢复时间与外周血中白细胞数成正比，外周血中白细胞数可代表血液系统受损的状况。

1.2 仪器和试剂

20 μ L 定量取血管、血球计数板、显微镜、1%盐酸等。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物：小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

1.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个辐射模型对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品于照射前给予 14—30 天，照射后仍然给予受试物，必要时可延长至 45 天。

1.3.3 实验步骤

受试样品组于照射前后经口连续给予受试样品，剂量组与辐射模型对照组均以同一剂量 γ 射线全身照射一次，照射剂量宜选择 3Gy—5Gy。分别于照射前、照射后第 3 天、照射后第 14 天三次采末梢血 20 μ L，加入 0.38mL 1%盐酸中，混匀后，加入血球计数板中，计算计数池中四个大方格中白细胞总数。

$$\text{白细胞数 (10}^9\text{/L)} = \frac{\text{四个大方格中白细胞总数}}{4} \times \text{稀释倍数} \times 10^7$$

1.4 数据处理及结果判定

白细胞数为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

照射前的外周血白细胞计数，用于各组间白细胞数目的均衡性检验，剂量组与辐射模型对照组比较，差异无显著性，再进行照射及后续实验。

照射后 3 天辐射模型对照组的白细胞数分别与照射前进行自身比较，差异有显著性，则判定辐射损伤模型成立；任一时间点、任一剂量组与辐射模型对照组比较，白细胞总数增多，差异有显著性，则可判定该实验阳性。

2. 骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数实验

2.1 原理

骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数降低是一次性全身 γ 射线照射引起辐射损伤的表现之一，在一定

范围内，照射剂量与骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数成反比，恢复时间与骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数成正比，骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数可代表造血系统受损的状况。

2.2 仪器和试剂

血球计数板、显微镜、注射器、手术器械、紫外分光光度计、Hank's 液等。

2.3 实验方法

2.3.1 实验动物：小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

2.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个辐射模型对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品于照射前给予 14—30 天，照射后仍然给予受试物，必要时可适当延长至 45 天。

2.3.3 实验步骤

受试样品组于照射前后经口连续给予受试样品，剂量组与辐射模型对照组均以同一剂量 γ 射线全身照射一次，照射剂量宜选择 3Gy—5Gy。于照射后第 3 天，颈椎脱臼处死动物，剥离出股骨，用 1mL 注射器（6.5 号针头）吸取一定体积的 Hank's 液，冲出股骨中的全部骨髓细胞；最后，让细胞悬液通过 4 号针头的注射器，使细胞在悬液中充分分散。

镜下计数。计算每 mL 骨髓细胞悬液中的有核细胞数。

或用紫外分光光度计 260nm 处测定 DNA 含量。

2.4 数据处理及结果判定

骨髓有核细胞数或骨髓细胞 DNA 含量为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

任一剂量组与辐射模型对照组比较，骨髓有核细胞数或骨髓细胞 DNA 含量增多，差异有显著性，则可判定该实验阳性。

3 小鼠骨髓细胞微核实验

3.1 原理

骨髓细胞微核数增高是一性全身 γ 射线照射引起辐射损伤的表现之一，在一定范围内，照射剂量与骨髓细胞微核率成正比，恢复时间与骨髓细胞微核率成反比，骨髓细胞微核数可代表机体染色体受损的状况。

3.2 仪器和试剂

解剖器械，生物显微镜，载玻片等。

小牛血清：小牛血清滤菌后放入 56℃ 恒温水浴保温 1h 进行补体活性灭活。—20℃ 保存。亦可用大、小鼠血清代替。

Giemsa 染液及应用液

1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8)

甲醇 (分析纯)

3.3 实验方法

3.3.1 实验动物: 小鼠, 体重 18—22g, 单一性别, 每组 10—15 只。

3.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个辐射模型对照组, 以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组, 另设二个剂量组, 必要时设阳性对照组。受试样品于照射前给予 14—30 天, 照射后仍然给予受试物, 必要时可适当延长至 45 天。

3.3.3 实验步骤:

受试样品组于照射前后经口连续给予受试样品, 剂量组与辐射模型对照组均以同一剂量 γ 射线全身照射一次, 照射剂量宜选择 3Gy—5Gy。于照射后第 3 天, 颈椎脱臼处死动物, 取胸骨或股骨, 用止血钳挤出骨髓液与玻片一端的小牛血清混匀, 常规涂片。或用小牛血清冲洗股骨骨髓腔制成细胞悬液涂片, 涂片自然干燥后, 放入甲醇中固定 5—10min, 放入 Giemsa 应用液中, 染色 10—15min, 立即用磷酸盐缓冲液或蒸馏水冲洗, 晾干。镜检, 每只动物计数 1000 个嗜多染红细胞中微核细胞数, 微核率以千分率表示。

抑制率计算:

$$A(\%) = \frac{C-D}{C-E} \times 100\%$$

式中 A—抑制率

C—致突变物对照组微核率

D—受试样品组微核率

E—阴性对照组微核率

3.4 数据处理及结果判定

采用卡方检验、泊松分布或方差分析等统计方法进行数据处理。

任一剂量组微核率低于辐射模型对照组微核率, 差异有显著性, 可判定该实验结果阳性。

4 血 / 组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性实验

4.1 原理

血 / 组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性降低是一次性全身 γ 射线照射引起辐射损伤的表现之一, 在一定范围内, 照射剂量与血 / 组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性成反比, 恢复时间与血 / 组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性成正比, 血 / 组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性可代表机体氧化还原反应系统受损的状况。

O_2^- 氧化羟基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 处有最大吸收峰, 可用分光光度法进行测定, 当 SOD 消除 O_2^- 后形成的亚硝酸盐减少。

4.2 仪器与试剂

仪器 721 分光光度计、离心机、恒温水浴、匀浆器

试剂

1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH7.8、SOD 标准品、三氯甲烷、95%乙醇 (v/v)、0.9%生理盐水

10mmol/L 盐酸羟胺

盐酸羟胺 6.95mg, 加 PBS 至 10mL

7.5mmol/L 黄嘌呤

黄嘌呤 11.41mg, 加 0.1M NaOH 2.5mL 溶解, 加 PBS 至 10mL

0.2mg/mL 黄嘌呤氧化酶

取 10mg/mL 黄嘌呤氧化酶 0.2mL 加冰冷 PBS 9.8mL 至 10mL

0.1%甲萘胺

取 0.2g α -甲萘胺溶于 40mL 沸蒸馏水, 凉至室温加 50mL 冰醋酸, 再加 110mL 凉蒸馏水至 200mL

0.33%对氨基苯磺酸

取 0.66g 对氨基苯磺酸溶于 150mL 温蒸馏水, 加 50mL 冰醋酸至 200mL

4.3 实验方法

4.3.1 实验动物: 小鼠, 体重 18—22g, 单一性别, 每组 10—15 只。

4.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个辐射模型对照组, 以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组, 另设二个剂量组, 必要时设阳性对照组。受试样品于照射前给予 14—30 天, 照射后仍然给予受试物, 必要时可适当延长至 45 天。

4.3.3 实验步骤

受试样品组于照射前后经口连续给予受试样品, 剂量组与辐射模型对照组均以同一剂量 γ 射线全身照射一次, 照射剂量宜选择 6Gy—8Gy。于照射后第 7 天, 进行实验。

4.3.3.1 红细胞抽提液制备: 10 μ L 全血冲入 0.5mL 生理盐水, 2000r/min 离心 3min, 弃上清, 加冰冷的双蒸水 0.2mL 混匀, 加入 95%乙醇 0.1mL, 振荡 30s, 加入三氯甲烷 0.1mL, 置快速混合器抽提 1min, 4000r/min 离心 3min, 分层, 上层为 SOD 抽提液, 中层为血红蛋白沉淀物, 下层为三氯甲烷, 记录上清液体积待测。

4.3.3.2 组织匀浆的制备: 剪取一定量的所需脏器, 生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎, 至玻璃匀浆器中加入冷生理盐水 20000r/min 匀浆 10s, 间歇 30s, 反复进行三次, 制成 1%组织匀浆, (最好用超声波发生器处理 30s), 使线粒体振破, 以中性红—詹纳氏绿 B 染色证明线粒体已振碎。以 4000r/min 离心 5min, 取上清液 20 μ L 待测。

4.3.3.3 SOD 标准抑制曲线 将 SOD 标准品用磷酸盐缓冲液配制成 750U/mL 的溶液, 再稀释到 50 倍, 即 SOD 量为 15U/mL (1.5 μ g/mL), 用本法测定不同量的 SOD 标准液的百分抑制率, 以百分抑制率为纵坐标, 以 SOD 活力单位 U/mL 为横坐标绘制标准曲线。

$$\text{SOD 百分抑制率} = \frac{\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%$$

计算

每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个单位。

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{\frac{(\text{对照管 OD}-\text{测定管 OD})}{\text{对照管 OD}} \times 100\%}{50\%} \times \frac{\text{反应液总量 (6mL)}}{\text{取液量}} \times \text{样品稀释倍数}$$

也可用酶比活法即以每管样品的百分抑制率从 SOD 标准曲线查出相应的 SOD U/mL，乘以稀释倍数 (1mL/取样量)。

若样品为组织匀浆液，根据匀浆浓度或组织蛋白质含量，将单位换算为 U/g 组织或 U/mg 蛋白。若样品为红细胞抽提液，根据血红蛋白含量，可换算为 U/g Hb。

4.3.3.4 样品测定步骤：

试剂	测定管	对照管
1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.8 (mL)	1.0	1.0
样品	A*	
10mmol/L 盐酸羟胺 (mL)	0.1	0.1
7.5mmol/L 黄嘌呤 (mL)	0.2	0.2
0.2mg/mL 黄嘌呤氧化酶 (mL)	0.2	0.2
双蒸水 (mL)	0.49	0.49
混匀，25℃恒温水浴 20min		
0.33%对氨基苯磺酸 (mL)	2.0	2.0
0.1%甲萘胺 (mL)	2.0	2.0
混匀 15min 后，倒入 1cm 光径比色杯，以蒸馏水调零，530nm 处比色测定 OD 值。		

* A 所用样品的量		
红细胞抽提液	10 μL	
血清 (或血浆)	20—30 μL (溶血样品剔除)	
1%组织匀浆	10—40 μL	

4.4 数据处理及结果判定

SOD 活性值为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 *F* 值，*F* 值<*F*_{0.05}，结论：各组均数间差异无显著性；*F* 值≥*F*_{0.05}，*P*≤0.05，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；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。

任一剂量组与辐射模型对照组比较，血 / 组织中 SOD 活性增强，差异有显著性，则可判定该实验阳性。

5 血清溶血素实验

5.1 原理

免疫系统是机体辐射损伤较敏感的组织之一，血清溶血素值可代表体液免疫系统的状况。在一定范围内，照射剂量与血清中溶血素水平成反比，恢复时间与血清中溶血素水平成正比，血清中溶血素可代表机体体液

免疫系统受损的状况。

5.2 实验方法

5.2.1 实验动物：小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

5.2.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个辐射模型对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品于照射前给予 14—30 天，照射后仍然给予受试物，必要时可适当延长至 45 天。

5.2.3 实验步骤

受试样品组于照射前后经口连续给予受试样品，剂量组与辐射模型对照组均以同一剂量 γ 射线全身照射一次，照射剂量宜选择 1Gy—3Gy。于照射后 20 天内，进行血清溶血素的测定。（可任选下列方法之一）

5.2.3.1 血凝法

5.2.3.1.1 原理

用 SRBC 免疫动物后，产生抗 SRBC 抗体（溶血素），利用其凝集 SRBC 的程度来检测溶血素的水平。

5.2.3.1.2 仪器和材料

SRBC、生理盐水、微量血凝实验板、离心机。

5.2.3.1.3 实验步骤

5.2.3.1.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血，将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中，朝一个方向摇动，以脱纤维，放入 4℃冰箱保存备用，可保存 2 周。

5.2.3.1.3.2 免疫动物及血清分离 取羊血，用生理盐水洗涤 3 次，每次离心（2000r/min）10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%（v/v）的细胞悬液，每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4~5 天后，摘除眼球取血于离心管内，放置约 1h，将凝固血与管壁剥离，使血清充分析出，2000r/min 离心 10min，收集血清。

5.2.3.1.3.3 凝集反应 用生理盐水将血清倍比稀释，将不同稀释度的血清分别置于微量血凝实验板内，每孔 100 μ L，再加入 100 μ L 0.5%（v/v）的 SRBC 悬液，混匀，装入湿润的平盘内加盖，于 37℃温箱孵育 3h，观察血球凝集程度。

血清凝集程度一般分为 5 级（0—IV）记录，按下式计算抗体积数，抗体水平 = $(S_1 + 2S_2 + 3S_3 + \dots + nS_n)$

式中 1、2、3……n 代表对倍稀释的指数，S 代表凝集程度的级别，抗体积数越大，表示血清抗体越高。

0 级 红细胞全部下沉，集中在孔底部形成致密的圆点状，四周液体清晰。

I 级 红细胞大部分沉集在孔底成圆点状，四周有少量凝集的红细胞。

II 级 凝集的红细胞在孔底形成薄层，中心可以明显见到一个疏松的红点。

III 级 凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层，中心隐约可见一个小红点。

IV 级 凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层，凝块有时成卷折状。

5.2.3.1.4 数据处理及结果判定

抗体积数为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

受试样品组的抗体积数显著高于模型对照组的抗体水平，可判定该项实验结果阳性。

5.2.3.1.5 注意事项

血清稀释时要充分混匀。最后一个稀释度应不出现凝集现象。

5.2.3.2 半数溶血值 (HC₅₀) 的测定

5.2.3.2.1 原理

用 SRBC 免疫动物后，产生抗 SRBC 抗体（溶血素），与 SRBC 一起孵育，在补体参与下，可发生溶血反应，释放血红蛋白，通过测定血红蛋白含量反映动物血清中溶血素的含量。

5.2.3.2.2 仪器和材料

721 分光光度计、离心机、恒温水浴、SRBC、补体（豚鼠血清）、SA 缓冲液、都氏试剂（碳酸氢钠 1.0g、高铁氰化钾 0.2g、氰化钾 0.05g，加蒸馏水至 1000mL）。

5.2.3.2.3 实验步骤

5.2.3.2.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血，将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中朝一个方向摇动，以脱纤维，放入 4℃ 冰箱保存备用，可保存 2 周。

5.2.3.2.3.2 制备补体 采集豚鼠血，分离出血清（至少 5 只豚鼠的混合血清），将 1mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中，放 4℃ 冰箱 30min，经常振荡，离心取上清，分装，-70℃ 保存。用时以 SA 液按 1:8 稀释。

5.2.3.2.3.3 免疫动物及血清分离 取羊血，用生理盐水洗涤 3 次，每次离心（2000r/min）10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%（v/v）的细胞悬液，，每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4~5 天后，摘除眼球取血于离心管内，放置约 1h，使血清充分析出，2000r/min 离心 10min，或 6000r/min，4min，收集血清。

5.2.3.2.3.4 溶血反应 取血清用 SA 缓冲液稀释（一般为 200~500 倍）。将稀释后的血清 1mL 置试管内，依次加入 10%（v/v）SRBC 0.5mL，补体 1mL（用 SA 液按 1:8 稀释）。另设不加血清的对照管（以 SA 液代替）。置 37℃ 恒温水浴中保温 15~30min 后，冰浴终止反应。2000r/min 离心 10min。取上清液 1mL，加都氏试剂 3mL，同时取 10%（v/v）SRBC 0.25mL 加都氏试剂至 4mL，充分混匀，放置 10min 后，于 540nm 处以对照管作空白，分别测定各管光密度值。

溶血素的量以半数溶血值 (HC₅₀) 表示，按下列公式计算，

$$HC_{50} = \frac{\text{样品光密度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的光密度值}} \times \text{稀释倍数}$$

5.2.3.2.4 数据处理及结果判定

血清溶血素含量为计量资料，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，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；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。

任一剂量组与辐射模型对照组比较，血清半数溶血值增多，差异有显著性，则可判定该实验阳性。

结果判定

在外周血中白细胞计数实验、骨髓细胞 DNA 含量或骨髓有核细胞数实验、小鼠骨髓细胞微核实验、血 / 组织中超氧化物歧化酶活性实验、血清溶血素含量实验中，任何两项实验结果阳性，可判定该受试样品具

有对电离辐射危害有辅助保护作用。

二十四、有助于排铅检验方法

1 动物实验

1.1 实验原理

实验动物经口给予含铅化合物（推荐使用醋酸铅），可造成组织中铅含量增高。造模早期以肝、肾、脑组织中增高明显，之后骨组织中铅含量逐渐增高。比较给予实验动物受试样品后，模型动物组织中铅含量的变化情况，以确定此受试样品是否具有促进机体排铅的作用。

1.2 实验动物

推荐使用成年大鼠，单一性别，体重 150—200 克，每组 8—12 只。小鼠则应使用近交系动物，单一性别，体重 18—22 克，每组 10—15 只。

1.3 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组、一个空白对照组和一个模型对照组，三个剂量组中应包括一个人体推荐量的 10 倍（小鼠）或 5 倍（大鼠）剂量组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.4 实验设计

本实验使用预防性高铅动物模型。

实验期间，在模型对照组、受试样品各剂量组饮用醋酸铅水溶液（推荐浓度为 0.1%—0.2%）或喂饲含铅饲料造模的同时，各剂量组灌胃给予受试样品或喂饲含不同剂量受试样品的饲料。空白对照组给予去离子水或基础饲料。

1.5 观察指标

于末次给予动物受试样品 24 小时后，称量动物体重。取血并处死动物，取适量血、肝、股骨样品，消化后使用石墨炉原子吸收分光光度计（或 ICP-MS 等方法）测定铅含量。

1.6 数据处理和结果判定

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 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），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。

结果判定：在动物模型成立的前提下，实验组与模型对照组比较，任一剂量组骨铅含量显著降低，同时血铅或肝铅含量显著降低，可判定该受试样品动物实验结果为阳性。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

有铅暴露接触史、血铅含量较高的自愿受试者。推荐选择属于血铅负荷偏高的人群，即血铅在 $200\mu\text{g/L}$ — $400\mu\text{g/L}$ （ $1\mu\text{mol/L}$ — $2\mu\text{mol/L}$ ）范围内，或尿铅在 $70\mu\text{g/L}$ — $120\mu\text{g/L}$ （ $0.34\mu\text{mol/L}$ — $0.58\mu\text{mol/L}$ ）范围内者。

2.2 受试者排除标准

- 2.2.1 血铅或尿铅过高，有明显铅中毒症状者。
- 2.2.2 患有心血管、肝、肾和造血系统等全身性疾病者。
- 2.2.3 妊娠和哺乳期妇女。
- 2.2.4 试验期间服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断者。
- 2.2.5 停药受试样品或中途加服其它药物，无法判断功效或资料不全者。

2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。按血铅、尿铅水平对受试者进行随机分组，在分组时尽可能考虑影响结果的主要因素如铅接触史、年龄、性别等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者有效例数不少于 50 例。

2.4.受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法和服用量每日服用受试样品，对照组服用等量安慰剂。试验组和对照组使用随机、盲法设定。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。试验期间受试者不改变生活、工作环境，不改变原来生活、饮食习惯。

2.5.观察指标

2.5.1 安全性指标

- 2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等。
- 2.5.1.2 血、尿、便常规检查。
- 2.5.1.3 肝、肾功能检查。
- 2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（各项指标于试验前检查一次）。
- 2.5.1.5 尿钙、尿锌的测定：测定时间、次数和方法同尿铅。总尿钙、总尿锌为试验开始后 3 次尿钙或尿锌测定值之和。

2.5.2 功效性指标

- 2.5.2.1 临床症状观察：准确记录受试者试食前后的主观症状，主要观察头晕、失眠、四肢无力等症状。
- 2.5.2.2 血铅、尿铅含量测定：采集试食试验前、试验后血液，以及试食前及试食第 10 天（如进行 45 天试验则为第 15 天）、20 天（如进行 45 天试验则为第 30 天）和结束时的 24 小时尿液样本（亦可以晨尿代替 24 小时尿，但需用尿肌酐进行校正），测定血铅、尿铅含量。总尿铅为试验开始后三次尿铅测定值之和。

2.6 数据处理和结果判定

血铅、尿铅、尿钙、尿锌等试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。自身对照资料可采用配对 t 检验；试食后不同观察时点两组血铅、尿铅的测定值均数比较以及试食后两组总尿铅、总尿钙、总尿锌排出量比较采用两样本均数 t 检验。后者需进行方差齐性检验，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，用转换的数据进行 t 检验；若经数据转换仍不能满足正态分布或方差齐要求，则改用 t' 检验或秩和检验。对于变异系数太大（如 $CV>50\%$ ）的资料，应使用秩和检验。

结果判定：试食后，试食组与对照组组间比较，至少两个观察时点尿铅排出量增加且显著高于试验前，或总尿铅排出量明显增加。同时，对总尿钙、总尿锌的排出无明显影响，或总尿钙、总尿锌排出增加的幅度小于总尿铅排出增加的幅度，可判定该受试样品具有有助于排铅的作用。