

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 $45-50\text{mg/kg BW.iv}$ 或 $125-130\text{mg/kg BW.ip}$ ，大鼠 $50-80\text{mg/kg BW.iv}$ 或 $120-160\text{mg/kg BW.ip}$ 。5—7 天后动物禁食 3—5 小时，测血糖，血糖值 $10-25\text{mmol/L}$ 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。

$$\text{血糖曲线下面积} = \frac{(\text{0 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 0.5}{2} + \frac{(\text{2 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 1.5}{2}$$

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。空白对照组不做处理，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%地塞米松注射量 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，空白对照组不做处理，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。

$$\text{血糖下降率}\% = \frac{(\text{实验前血糖值} - \text{实验后血糖值})}{\text{实验前血糖值}} \times 100\%$$

$$\text{血糖曲线下面积} = \frac{(0 \text{ 小时血糖} + 0.5 \text{ 小时血糖}) \times 0.5}{2} + \frac{(2 \text{ 小时血糖} + 0.5 \text{ 小时血糖}) \times 1.5}{2}$$

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 ($C_4H_2N_2O_4 \cdot H_2O$, 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 ($150 \pm 20g$)，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。空白对照组不做处理，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—105mg/kg BW 腹腔注射，注射量 1ml/100g 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，空白对照组不做处理，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 $\geq 10mmol/L$ ，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。

$$\text{血糖下降率}\% = \frac{(\text{实验前血糖值} - \text{实验后血糖值})}{\text{实验前血糖值}} \times 100\%$$

$$\text{血糖曲线下面积} = \frac{(\text{0 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 0.5}{2} + \frac{(\text{2 小时血糖} + \text{0.5 小时血糖}) \times 1.5}{2}$$

1.4.2.2.2.3.2 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。

1.4.2.2.2.3.3 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。

$$\text{胰岛素抵抗指数} = \frac{\text{胰岛素}}{22.5e^{-\ln \text{血糖}}} \approx \frac{\text{血糖} \times \text{胰岛素}}{22.5}$$

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。

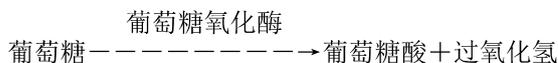
1.6.4 血红蛋白能使过氧化氢过早分解，亦干扰反应，致使测得血糖值偏低。故对已溶血的全血或血清必须制备无蛋白滤液后，再进行测定。

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）50 μ L 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 $^{\circ}$ C 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

测定管 OD
 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