

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。

1.3.4.1.3 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、体重增量、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量低于模型对照组，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。