

附件 6 :

辅助降血脂功能评价方法

试验项目、试验原则及结果判定 Items, Principles and Result Assessment

根据血脂异常的类型，辅助降血脂功能按照不同的血脂类型设立分类的动物试验和人体试食实验。

1 试验项目

- 1.1 根据受试样品的作用机制，分成三种情况
 - 1.1.1 辅助降低血脂功能：降低血清总胆固醇和血清甘油三酯
 - 1.1.2 辅助降低血清胆固醇功能：单纯降低血清胆固醇
 - 1.1.3 辅助降低血清甘油三酯功能：单纯降低血清甘油三酯
- 1.2 观察指标
 - 1.2.1 体重
 - 1.2.2 血清总胆固醇
 - 1.2.3 血清甘油三酯
 - 1.2.4 血清高密度脂蛋白胆固醇
 - 1.2.5 血清低密度脂蛋白胆固醇
- 1.3 人体试食试验
 - 1.3.1 血清总胆固醇
 - 1.3.2 血清甘油三酯
 - 1.3.3 血清高密度脂蛋白胆固醇
 - 1.3.4. 血清低密度脂蛋白胆固醇

2 试验原则

- 2.1 动物实验和人体试食试验所列指标均为必测项目。
- 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。
- 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。
- 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。

3 结果判定

- 3.1 动物实验：
 - 3.1.1 混合型高脂血症动物模型

辅助降低血脂功能结果判定：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，可判定该受试样品辅助降低血脂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，可判定该受试样品辅助降低血清胆固醇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，可判定该受试样品辅助降低血清甘油三酯功能动物实验结果阳性。

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，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，可判定该受试样品辅助降低血清胆固醇功能动物实验结果阳性。

3.2 人体试食试验

指标判定标准：

有效：TC 降低 $>10\%$ ；TG 降低 $>15\%$ ；HDL-C 上升 $>0.104\text{mmol/L}$ 。

无效：未达到有效标准者。

3.2.1 辅助降低血脂功能结果判定

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，试验组总有效率显著高于对照组，可判定该受试样品辅助降低血脂功能人体试食试验结果阳性。

3.2.2 辅助降低血清胆固醇功能结果判定

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，可判定该受试样品辅助降低血脂功能人体试食试验结果阳性。

3.2.3 辅助降低甘油三酯功能结果判定

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，可判定该受试样品辅助降低甘油三酯功能人体试食试验结果阳性。

辅助降低血脂功能检验方法

Method for the Assessment of Assisting Blood Lipids Reduction Function

根据血脂异常的类型，辅助降低血脂功能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. 混合型高酯血症动物模型
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. 辅助降低血脂功能
2. 辅助降低血清胆固醇功能
3. 辅助降低甘油三酯功能

1 动物实验检验方法

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%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、钾：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对照组。每周称量体重 1 次。

模型对照组给予模型饲料 1—2 周后，空白对照组和模型对照组大鼠不禁食采血（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 水平将模型对照组随机分成 4 组，分组后空白对照组和模型对照组比较 TC、TG、LDL-C、HDL-C 差异均无显著性。

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， $36F$ 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：

辅助降低血脂功能结果判定：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，可判定该受试样品辅助降低血脂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，可判定该受试样品辅助降低胆固醇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，可判定该受试样品辅助降低甘油三酯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。

1.1.8.3 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。

1.2.2 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种大鼠，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对照组。每周称量体重 1 次。

模型对照组给予模型饲料 1-2 周后，空白对照组和模型对照组动物不禁食采血（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 水平将模型对照组随机分成 4 组，分组后空白对照组和模型对照组比较 TC、TG、LDL-C、HDL-C 差异均无显著性（ $P>0.05$ ）。

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， $36F$ 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：

辅助降低胆固醇功能结果判定：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，可判定该受试样品辅助降低胆固醇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 人体试食试验检验方法

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，血清总胆固醇在 5.18-6.21 mmol/L，并且血清甘油三酯在 1.70-2.25 mmol/L，可作为辅助降低血脂功能备选对象；血清甘油三酯在 1.70-2.25 mmol/L，并且血清总胆固醇 ≤ 6.21 mmol/L，可

作为辅助降低甘油三酯功能备选对象；血清总胆固醇在5.18-6.21mmol/L，并且血清甘油三酯 \leq 2.25mmol/L，可作为辅助降低胆固醇功能备选对象，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 原发性高脂血症。

2.1.3 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 近两周曾服用调脂药物，影响到对结果的判断者。

2.2.5 住院的高血脂症者。

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

采用自身和组间两种对照设计。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 胸透、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 $>10\%$ ；TG降低 $>15\%$ ；HDL-C上升 $>0.104\text{mmol/L}$ 。

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；方差齐方但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。有效率及总有效率采用 X² 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 辅助降低血脂功能结果判定：

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，试验组总有效率显著高于对照组，可判定该受试样品辅助降低血脂功能人体试食试验结果阳性。

2.6.2 辅助降低血清胆固醇功能结果判定：

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，可判定该受试样品辅助降低血脂功能人体试食试验结果阳性。

2.6.3 辅助降低甘油三酯功能结果判定：

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，可判定该受试样品辅助降低甘油三酯功能人体试食试验结果阳性。