

4.2 安全检定

4.2.1 安全试验 采用较人用剂量多出数倍的试样(按体重计算),给小鼠口服,观察对小鼠健康是否有不良影响。规程规定取 2 g 制品溶解在 8 mL 无菌生理盐水中,20~22 g 小白鼠 5 只,每只灌胃 0.5 mL,每天 1 次,连续 3 d,并观察反应至第 7 天,小鼠应健康活存,体重增加。

4.2.2 杂菌检查 口服活菌制剂不得污染大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和志贺氏菌等致病性细菌,检查时可采用上述致病菌选择特异培养基。参照口服药卫生学指标要求,口服活菌制剂非致病性杂菌数不得超过 1 000/g,霉菌数不超过 100 /g。对于非口服制剂,卫生学指标另有规定。

4.3 效力检定 益生菌制品多以制品中益生菌活存数表示效力。活菌计数,通常采用平板法即先使细胞分散、定位、增值后,再做菌落计数,也称之为细胞集落形成试验,以每克(每毫升)细菌集落数表示(CFU/g, CFU/mL)。对于多种细菌制成的活菌制剂,则应分别在各种菌的特异培养基平板上计数。一般胶囊制剂或片剂按规程规定测定方法应为:无菌称取 3 g 制剂,加入适宜稀释液中,充分摇匀,作 10 倍系列稀释(根据不同制品不同指标),取量后稀释度 0.1 mL 滴入适宜琼脂平皿上,共做 3 个平皿,并以“L”棒涂布均匀,置适宜条件下培育,到期观察每个平皿菌落生长情况,并计数,但必须注意,当平皿菌落数小于 10 或大于 100 时,都应重新调整稀释度重新测定。根据 3 个平皿菌落总数可按下列公式计算活菌数。

$$\frac{3 \text{ 个平皿菌落数之和}}{3} \times 10 \times \text{最后稀释度} = \text{活菌数(CFU/g)}$$
 活菌数用“CFU”表示,即为细菌集落单位。

一切工业产品都要求把质量放在首位。微生态制剂也不例外,益生菌制品,也称活菌制剂,是最为广泛使用的微生态制剂,它是用于临床治疗或保健的具有生物活性的制品;其质量具有自身的特殊性和重要性。益生菌直接用于特定患者、年老体弱者或者直接用于健康人,益生菌制品质量优劣直接关系到使用者的疗效和安全,因而更须强调“质量第一”的原则。

5 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部.中国生物制品规程(第一部).1995
- 2 卢锦汉,等.医学生物制品学.北京:人民卫生出版社,1995
- 3 袁佩娜.益生菌的质量控制.见:双歧杆菌.大连:大连海事大学出版,1998
- 4 袁佩娜.97 全国现代微生态学实验技术研讨班,1997
- 5 袁佩娜.微生态制剂安全性有效性检查方法.中国微生态学杂志,1996,8(5)
- 6 袁佩娜.微生枋制剂的菌种及其管理.中国微生态学杂志,1996,8(6)
- 7 周德庆,等.对发展我国微生态制剂产业的几点看法.今日微生物学信息,1997

《保健食品功能学评价程序和检验方法》的有关技术问题

严卫星 何来英 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

为了使保健食品健康有序地发展,卫生部颁布了于 1996 年 6 月 1 日正式生效的《保健食品管理办法》,使我国的相关管理纳入了法制轨道。保健食品是一类特殊的食品,其生产经营必须有一套严格、科学的评价程序。为此,卫生部颁布了《保健食品功能学评价程序和检验方法》(以下简称《程序和方法》)。

《程序和方法》是从 80 年代后期开始编写的。根据当时市场上的产品情况,对 12 类保健食品的功能,从评价指标、检验方法、评价原则和评价标准等方面作了明确、详细的规定。从颁布执行到 1998 年 3 月,卫生部认定的 28 个保健食品功能检测机构按照《程序和方法》共检测试样 2119 个,到 1998 年 3 月为止已有 1270 个

获得了卫生部颁发的批准文号。

通过实践,该《程序和方法》获得了各检测机构的认可,在全国保健食品功能检测机构工作会议上得到了与会者的充分肯定。同时,通过对大量试样的评价,也验证了该《程序和方法》的科学性和可行性。另外,从市场产品的数量也可以反映出《程序和方法》在保健食品的规范管理中所起的积极作用。原来估计市场上有约3000个产品,到目前为止,实际送检的产品不足2000个,还有1000多个产品未进行功能评价。未送检的原因估计主要是,生产者依据《程序和方法》判断,自己的产品能否通过功能评价缺乏信心,一是配方依据不足,二是缺乏科学的验证工作。不符合要求的所谓的保健食品退出了市场,而符合《程序和方法》的要求,通过功能评价并获得批文的产品,基本上都是配方有理论依据、功效确切的产品。总的说来,《程序和方法》是可行的,为我国保健食品市场健康、有序地发展起到了积极的作用。

依法管理保健食品才刚刚起步,因而有一个认识、再认识的不断完善的过程。随着实践经验的不断积累、认识的逐步提高以及保健食品市场发展的需要,在《程序和方法》的运行过程中,有些不尽完善的地方需要进一步修改和补充。《程序和方法》主要存在以下几个方面的问题 ①检测方法中有共同存在的问题,如受试物的处理、对照组的设置,对申报某些功能的受试物进行兴奋剂等违禁药物的检测等未作统一规定。②有些功能试验所选用的指标其检测方法未作明确规定,或者规定得不具体。③某些功能的结果判定标准不够明确。④有些功能的判定标准需要进一步提高,使进入市场的产品具有更高的技术含量。⑤只列举12个功能的评价程序和检验方法,迫切需要增加其它功能的评价程序和检验方法,以满足保健食品市场发展的需要。

针对所存在的问题,提出了一个初步修订方案,已经全国保健食品功能学检测机构会议讨论,下面是有关的几项技术问题的修改建议。

1 对申报某些功能的受试物应提出特殊要求 因某些兴奋剂、激素等可以使抗疲劳、促进生长发育、减肥、改善性功能等功能试验获得阳性结果,个别厂家为此而人为地加入了违禁药,故对这些功能受试物的申报,应进行兴奋剂、激素等违禁药的检测。

2 应考虑增加对受试物处理的原则规定

2.1 推荐量较大、超过动物承受容量的保健食品,允许去除受试物中非功效成分,而仅使用功效成分进行功能试验。

2.2 对于含乙醇的受试物,原则上应使用其定型的产品进行功能试验,其三个剂量组的乙醇含量相同,如乙醇含量在38%以上,允许将其含量降低至20%~38%之间。如其推荐量较大,超过动物能承受的容量时,允许将其进行浓缩,但最终的浓缩液体应恢复原乙醇含量,并在20%~38%之间。当进行果蝇试验时,允许将乙醇去除。调整受试物乙醇含量及稀释含乙醇的受试物时,原则上应使用本产品的酒基。

2.3 液体受试物需要浓缩时,应不破坏其中的功效成分。浓缩条件可用60℃~70℃减压或常压蒸发。浓缩的倍数依具体试验要求。

2.4 对于以冲泡形式饮用的受试物(如袋泡剂),可使用该受试物的水提取物进行功能试验,提取的方式应与产品推荐饮用的方式相同。如产品无特殊推荐饮用方式,则采用下述提取的条件:常压,温度80℃~90℃,时间30~60min,水量为受试物体积的10倍以上,提取1~2次,将其合并浓缩至所需浓度。

2.5 试样如有遇液体即膨胀的成分,试验时可放入饲料中,由动物自由进食。

3 给受试物的方式 受试物给予方式必须经口,如:灌胃、加入饮水或饲料中,各种给样途径均应尽可能准确计算受试物的食入量。

4 有关对照设定的特殊规定

4.1 含乙醇的受试物在进行功能试验时,应增设与受试物乙醇含量相同的酒基对照组。

4.2 进行抗疲劳功能试验时,凡受试物中含蔗糖或葡萄糖等(不包括淀粉)的总糖含量在30%以上的(含

30%),应增设与中等剂量组相同糖含量的对照组;含糖量在30%以下者暂不考虑设置。

4.3 以食物为载体的保健食品,当食品本身可能具有同样功效时,应将该食物本身作为对照。进行生长发育功能试验时,使用含有奶或奶粉的受试物时,应增设奶或奶粉对照组。

4.4 以传统食品作为保健食品时,原则上应将同类食品作为对照。如在啤酒中添加某些物质或经特殊工艺处理使其具有某种特定保健功能,在进行功能试验时应将原啤酒作为对照。

4.5 对于通过补充营养素或促进营养素的消化、吸收、利用来达到促进生长发育或增加骨密度等功效的保健食品进行功能试验时,可以以我国人群营养素摄入水平及消化吸收资料为参考设定对照组,一般来说对照组中营养素的量常低于日摄入推荐量。

5 免疫调节作用

5.1 规定体重、脏器/体重比值为必测指标。

5.2 增加免疫功能低下的模型动物指标。

5.3 判定细胞免疫、非特异性免疫单方面有效的标准修改为:至少选择该方面的两个试验,且结果均为阳性。

5.4 判定体液免疫单方面有效的标准,①至少选择两个试验且结果均为阳性,②如选择抗体生成细胞试验,可以只选一个试验,但要求至少两个剂量组阳性。符合上述二者之一可判定为有效。

6 延缓衰老作用

6.1 提供衰老模型动物。

6.2 考虑增加以其它衰老模型理论为依据设定的评价指标。

6.3 果蝇生存试验

6.3.1 不同果蝇的生存寿命不同,故应统一使用同一品种—Oregon K。果蝇生存试验的各组样本数增加为200只。

6.3.2 剂量不作规定,按实际推荐量计算。从分窝2周后开始给予受试物。

6.3.3 果蝇生存试验判定标准,①两个性别平均寿命指标均阳性。②单一性别平均寿命和最高寿命两项指标阳性或者平均寿命和半数死亡时间两项指标阳性,且与对照组比,半数死亡时间延长5d。符合上述二项之一者判定为阳性。

7. 改善记忆作用

7.1 动物试验

7.1.1 正常动物与记忆障碍模型动物任选其一进行试验。

7.1.2 重复一次试验中应规定至少有一个剂量在两次试验中结果均为阳性,方可认为重复测试结果一致。

7.2 人体试验 应统一使用临床记忆量表。

7.2.1 试验原则 对照、双盲、随机。服样前在两组记忆商均衡的前提下,随机抽取一组为试验组,另一组为对照组。

7.2.2 测试指标 a. 指向记忆,b. 联想学习,c. 图象自由回忆,d. 无意义图形再认,e. 人像特点联系回忆等。五项指标必须测试完整。

7.2.3 测试顺序 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。

7.2.4 结果判定 将五项分测验成绩分别查其相应的量表分后,计数总量表分,再查记忆商。试验组与对照组的记忆商差异有显著性,可判定为该受试物有改善人体记忆作用。

8 促进生长发育作用

8.1 考虑删除雌雄比例、长毛时间等指标的观察,增加仔鼠身长的测量。

8.2 胎仔情况一栏指标作为一般观察,不列入结果判定的依据。

8.3 体重在多个时间点进行测定,结果为两个或两个以上时间点体重阳性,或任一时间点体重、身长两项指标阳性,可以认为有促进体重增长的作用。仔鼠的称重在断乳前可以以窝为单位。

8.4 生理发育指标判定为有效的标准是:至少有两个生理发育指标阳性。应对全部仔鼠进行生理发育指标的观察。

8.5 神经反射指标判定为有效的标准是:至少有三个神经反射指标阳性。对于多个时间点进行测定的神经反射指标,必须2个或2个以上时间点测定结果为阳性才可判定该项指标阳性。动物数量应为每组10窝,每窝至少测定2只仔鼠。

8.6 实验期限修改为出生后至6周。

8.7 结果判定改为:在体重、生理发育、神经反射3类指标中有2类或2类以上阳性,其中一类必须是体重或身长,才可认为受试物有促进生长发育的作用。

9 抗疲劳作用

9.1 明确乳酸测定必须有3个时间点,分别为游泳前、游泳后立即及游泳后休息30 min。

9.2 血乳酸的判定标准:血乳酸的判定以升高幅度和消除幅度为判定标准,升高幅度小于对照组或消除幅度大于对照组均可判定为该项指标阳性。

9.3 抗疲劳评价标准,考虑增加 a. 游泳试验3个剂量组阳性,一项生化指标阳性。 b. 游泳试验阳性,两项生化指标阳性。符合上述两项之一者可判定该受试物有抗疲劳作用。

10 减肥作用

10.1 动物试验中除大鼠肥胖模型外,增加预防大鼠肥胖的试验方法。

10.2 进一步具体确定人体试食试验方法,规定体内脂肪含量的测定方法:水下称重法和电阻抗法都可选用。耐力的测试方法必须考虑减去的体重负荷对耐力的影响等,最好选用功率自行车法。

10.3 以各种营养素为主要成分替代主食的减肥食品可以不进行动物试验,仅进行人体试食试验。

11 耐缺氧作用

11.1 增加亚硝酸钠中毒试验、急性脑缺血性缺氧试验

11.2 可考虑设立提高应激能力的功能,将耐缺氧、抗低温、抗高温等纳入其中。

11.3 结果判定:3项试验中3项试验结果阳性,可判定有耐缺氧作用。

12 抗辐射作用

12.1 应着重考虑低剂量多次照射对机体健康的影响,可将一次照射与多次照射结合起来综合评价,考虑不针对一次性单独照射下结论,将多次照射的次数作适当调整,缩短一些。

12.2 致突变试验的结果判定除统计检验差异有显著性外,应考虑增加抑制率指标。

12.3 考虑增加部分免疫学及与氧化有关的指标,对抗辐射功能进行综合评价。

13 抗突变作用

13.1 规定两种菌株三种作用途径均为必做项目。但结果判定仅要求一种菌株一个作用途径结果阳性即可。

13.2 Ames 试验要求有剂量反应关系。Ames 试验在重复一次时,应规定至少有一个相同剂量在两次试验中结果均为阳性,才可判断两次结果一致。

13.3 Ames 试验一种途径有效时可终止试验,并判定该试验为阳性。三种途径都无效时,才可判定无效。

13.4 判定抗突变作用时,除有统计学意义外,还要求达到一定的抑制率。

14. 抑制肿瘤作用

14.1 将抑制肿瘤功能名称作修改为:①辅助抑制肿瘤②预防化学致癌③减轻放、化疗的毒副作用。后两种作用应是保健食品发展的主要方面。

14.2 辅助抑制肿瘤的结果判定标准改为两个或以上瘤株,重复一次,除瘤重差异有统计学意义外,要求有30%或以上的抑瘤率,至少有一个相同剂量组在两次试验中结果均为阳性。对免疫学指标的要求同原程序。

14.3 预防化学致癌选择的试验为:动物诱发性肿瘤试验和免疫学试验。

14.4 减轻放、化疗的毒副作用主要针对放、化疗的毒副作用来选择试验的指标。动物试验可重点考虑与免疫系统有关的一些指标:细胞免疫、体液免疫、NK 细胞功能、吞噬细胞功能、白细胞计数、白细胞介素等等。这些指标应在荷瘤动物或正常动物经放、化疗后进行观察。应尽可能进行人群试食观察,选择的指标除免疫系统外,还可对减轻胃肠道等系统的毒副作用进行观察。

15 调节血脂作用

15.1 动物试验为必做项目。预防性高血脂模型法和高血脂模型法任选一种。

15.2 结果判定改为:在总胆固醇、甘油三脂、高密度脂蛋白胆固醇三项指标中 ①两项或以上指标阳性可判定有调节血脂作用。②单项指标阳性(仅限总胆固醇和甘油三脂两个指标)时,则必须有两个或以上剂量组结果阳性,可判定有调节总胆固醇或甘油三脂的作用。

15.3 删除原程序中规定的高密度脂蛋白胆固醇单项指标阳性及总胆固醇下降 $>10\%$,或甘油三脂下降 $>15\%$,或高密度脂蛋白胆固醇升高 4mg/dL 即可下结论的内容。

15.4 将人体试验列为必做项目。

16 改善性功能作用

16.1 交配试验中选择的6个指标,应至少有2个指标阳性方可对交配试验下结论。以交配试验为优先选择。

16.2 人体试食试验为必做项目,而且应在动物试验有效的前提下进行。提出人体试食试验选择的指标、测试的方法以及评价的标准。

以上所提出的修订内容,已在今年3月召开的全国保健食品功能评价检测机构会议上进行了讨论,与会者基本达成共识。希望各功能检测机构在实践过程中进一步提出修改意见,共同探讨,逐步完善该《程序》。

17 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南(药学 药理学 毒理学)
- 2 中华人民共和国卫生部药政管理局. 新药(西药)临床研究指导原则汇编
- 3 中华人民共和国卫生部制定发布. 中药新药临床研究指导原则. 第三辑. 1997
- 4 中华人民共和国卫生部药政管理局. 新药药理研究指南(药理学 药学 毒理学)
- 5 卫生部卫生监督司.《保健食品管理法规汇编》.第2版. 长春:吉林科学技术出版社,1998
- 6 徐叔云,等. 药理实验方法学. 北京:第2版. 人民卫生出版社,1991
- 7 曲绵域,等. 实用运动药学. 北京:北京科学技术出版社,1996
- 8 “临床记忆量表”手册编写组. 临床记忆量表手册. 中国科学院心理研究所,1984
- 9 何来英,等. 保健食品抗疲劳作用试验方法的研究. 中国食品卫生杂志,1997,9(4):1