

健康食品之骨質保健功效評估方法

880802 衛署食字第 88037803 號公告

920829 衛署食字第 0920401629 號公告修正

1020205 署授食字第 1011304250 號修正發布

壹、前言

人體共有 206 塊骨骼，依外形可分為長骨、短骨、扁平骨和不規則骨等。骨骼的外層是「皮質骨」(cortical)，含有板層結構，其間含有細胞，因其結構緻密，又稱之為「緻密骨」(compact bone)；骨骼的內層則是「枝狀骨」，富含骨小樑(trabecular)，在骨小樑的表面則有「造骨細胞」(osteoblast, OB) 和「蝕骨細胞」(osteoclast, OC)，其像海綿狀，因此又稱為「海綿骨」(spongy bone)。體內約有 80% 的骨量屬於皮質骨，但身體各部位的骨骼所含皮質骨與海綿骨的比例並不相同，例如脊椎骨含有 50-75% 的海綿骨，而股骨則只有約 20% 是屬海綿骨，且主要是分布在兩端。

一、骨骼的代謝

由於海綿骨的表面積較大，所以骨骼的代謝速率較快，當骨骼因某因素而產生骨質流失時，主要的流失部位即在海綿骨，在一般的代謝情況下，每年約有 25% 的海綿骨被分解和更新，但只有約 3% 的皮質骨會被新陳代謝。這也是何以脊椎骨較易發生骨質疏鬆，造成身高變矮或駝背的原因；又由於股骨的海綿骨分布在兩端，因此年輕人骨質較緻密，若因撞擊而產生骨折時，常折斷在股骨的中央部位，但若已年老發生骨質流失之後，當跌倒而骨折時，則常發生在股骨的兩端，尤其斷裂在與骨盤連接的位置，而很難醫治和恢復。

骨骼的成分可分為有機質與無機質。有機質部分包括了骨基質和細胞，骨基質中有 95% 是膠原蛋白，另 5% 的非膠原蛋白質對骨骼的礦物質化(mineralization)很重要，而細胞主要有 OB、OC 和骨細胞(osteocyte)三種；無機質中主要有磷酸鈣，其他還有碳酸鹽、鈉、鎂、鉀、氟化物和氯化物等。

骨骼的細胞可分為 OB、OC 和骨細胞三種。其中之 OB 主要在進行膠原蛋白(collagen)和基質(ground substances)之形成，以及負責大部分之骨礦物質化(bone mineralization)。然而當 OB 被骨間質(bone matrix)包圍，會逐漸縮小

體積而變成骨細胞。在一般骨骼中，骨細胞含量穩定，其內之胞器 (organelles) 含量少，僅含少量之粒腺體 (mitochondria) 和高基氏體 (Gorgi apparatus)，代謝力不旺盛。OC 較大、多核，且具多量的粒腺體和溶小體 (lysosome)，顯示其進行異化作用和骨骼回收的能力相當強；其細胞膜含有豐富的皺褶，具有電化學極化性，可使細胞膜之滲透壓改變，而得以攝入斷裂的膠原蛋白和 hydroxyapatite，並加以消化。

骨骼無論在成長期或成年期，一直不斷地由 OC 進行骨質分解，而由 OB 進行重造。當重造的速率大於分解時，則骨骼會變得較長、較寬或較緻密；而當分解速率大於重造時，則骨質就會逐漸流失 (bone loss) 而疏鬆。通常在成長期，骨骼主要會增長，而在青春末期時，長骨之骨垢 (epiphyses) 與骨幹 (diaphyses) 癒合在一起之後，大約再經 2-3 年，骨骼就不再增長，因此，身高也就不再增加了。但在此年齡之後，若營養狀態良好，也保持適當的抗阻力運動，則骨質的重造仍然繼續維持大於骨質的分解，因此骨質的密度仍會持續增加。當生理狀態良好時，此現象可持續至 35-40 歲左右，而達一生中骨質量之最高點 (peak bone mass)，但過了 45 歲之後，尤其女性在剛停經後的連續 5 年，骨質之分解會明顯大於重造，以致造成骨質流失，骨質密度下降，嚴重時會引起骨質疏鬆症 (osteoporosis)。

二、營養對骨骼代謝的影響

由於人體的骨骼並非是無生命現象的架子而已，而是終生不斷地分解與重造 (remodeling)，因此若只測量當時的密度，並不能真正了解骨骼新陳代謝的實際情況，而得以及時設法加以改善。骨質流失是一種無症候的生理現象，儘管骨質流失了 20-30%，甚至超過此數值，若無骨折，很難被察覺到。即使是測其骨質密度，則必須該密度已有明顯下降才能被察覺，而此時骨質已流失某相當程度了，很難補救。然而目前在臨床上還沒有適當簡易之骨骼新陳代謝的生化指標，以便及早診斷其骨骼的生理代謝 (turnover) 狀況。因此在營養生理上，能夠提供促進骨骼重造的營養素，亦常作為加強骨質密度的重要保健方法。

營養素之所以會被認為與骨質疏鬆症有關，主要是因骨骼構造中的有機質

健康食品之骨質保健功效評估方法

為蛋白質，而無機質為多種礦物鹽沈澱組成，因此如飲食中之某些營養素量不適當時，會影響骨骼代謝之平衡，而造成骨質流失。在所有的營養素中，通常鈣質被認為對骨骼的結構與代謝最為重要，也最是一般人所較易缺乏而影響到骨骼的健康。

當飲食中鈣攝取量偏低時，身體會產生負鈣平衡。當血液中之鈣離子濃度偏低 ($<10 \text{ mg/dL}$) 時，會刺激增加副甲狀腺激素 (PTH) 之分泌，而 PTH 可刺激腎臟內的活化使 25-(OH)-D3 轉變成具生理活性之 1,25-(OH)₂-D3，然後 PTH 和 1,25-(OH)₂-D3 共同改變了骨骼中 hydroxyapatite 的離子價，此現象導致使 orthophosphate 轉變成 pyrophosphate，以致 hydroxyapatite 變得易解離而排出鈣離子，來提升血液中鈣離子濃度，此生理現象稱為骨質回收 (bone resorption)。此生理機制雖能用來維持血液中鈣離子濃度的恆定，但亦造成骨質的流失，持續的流失會導致骨質的疏鬆。體內負鈣平衡的發生，並不單是飲食中缺鈣才會發生，例如激素分泌的不正常或維生素 D 的缺乏等，都會導致骨鈣的負平衡，而引發骨質的疏鬆。

三、評估食品樣本是否具有骨質保健之測定方法

由於骨骼代謝的影響因子眾多，且例如『負重運動』等生活形態無法避免，並可有很大誤差之強烈影響因子，可能很容易模糊掉『飲食因子』對骨質的影響效應，因此本評估方法除可採信人體試驗以『骨密度』作為主要依據之指標外，也認可『骨代謝生化指標』是能評估受試食品對骨質影響功效的更敏感又可靠之指標。停經後婦女或進行卵巢切除之動物模式，骨代謝指標得以 OC 活性為主要指標；而青少年或成長期動物試驗則以 OB 活性為主要指標。

人類與不同品系實驗動物的抗體多少會有些差異，目前市面上已有適用於人類或大鼠等屬性有所不同之現成商業試劑套組 (test kits)。據許多實驗室的測定經驗，如果使用目前市售適用於評估人體 OB、OC 活性指標的試劑來測定大鼠，會產生明顯的誤差值；而不同公司的產品間亦可能會有差值，因此必須小心選擇適合人體或動物抗體之試劑，且應前後使用同一試劑產品，才能互相比較與獲得較正確之檢測結果。

健康食品之骨質保健功效評估方法

廠商除提供與其產品功效相關之文獻資料，以佐證該產品或其部分原料可能具有骨質保健之功能，以及產品對人體無安全顧慮外，必須針對已上市或預備上市之產品，進行下列所建議之「動物試驗」或「人體試驗」，以獲得能宣稱該產品具骨質保健相關用詞之認證。

貳、動物試驗模式

一、動物與飼養：

實驗動物模式可因產品的特性，與欲宣稱的內容而選擇使用『成長期』、『更年期卵巢切除』或其他有適當文獻（申請健康食品認證時，應檢附文獻）支持之動物模式，但不宜使用基因缺陷之動物。試驗原則上須按下列之建議，且試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

二、委託測試機構與主持人：

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與骨生理相關之專業背景與研究經驗或著作；試驗並須事先經過執行單位之動物試驗委員會審查通過。

三、試驗動物：

動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。

（一）成長期動物模式：

凡欲證實產品有助於骨骼之成長，應進行本試驗。動物可選用剛斷乳 2 週內開始正式進行的正常大鼠（Wistar or SD rats）、倉鼠（hamsters）、小鼠（mice）之齧齒類動物或其他有適當文獻（申請健康食品認證時，須檢附文獻）支持普遍使用之實驗動物。性別除特殊需要外，建議使用雄性較佳。

（二）更年期動物模式：

宜使用正常生育期大鼠（Wistar or SD rats）、倉鼠（hamsters）、小鼠（mice）之齧齒類動物或其他有適當文獻（申請健康食品認證時，須檢附文獻）支持普

健康食品之骨質保健功效評估方法

遍使用之生育年齡雌性實驗動物。由於骨代謝與雌激素有密切關係，實驗前採用雙側卵巢切除方式，作為模擬停經後的動物骨質疏鬆研究模式。卵巢切除後經 1-2 週之恢復，即開始進行正式產品試驗。

(三) 試驗動物數目與實驗期限：

每組試驗動物 ≥ 8 隻(如使用實驗最終體重 < 250 克之較小型動物時，每組試驗動物 ≥ 12 隻)。實驗期之長短自行視產品特性或試驗動物特質，以及使用指標之需要而擬定，通常成長期模式為 4-12 週；更年期模式不宜少於 12 週。

四、飼養條件：

實驗動物須使用單一性別。動物宜飼養在恆溫 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、亮暗各 12 小時之動物房。飼養或處理時應避免動物驚嚇，且每次必須前後一致，使誤差值相近。

五、試驗材料：

試驗產品之『功效成分』以整體產品為考量，得為某一明確化學成分為主，也得為幾項成分或食材之複方產品。該項主成分或配方對骨代謝之影響機制得在科學上尚不明白，但必須確定在該劑量長期服用對人類應無明顯之安全顧慮。試驗食品之添加應以欲上市的整體產品為考量，而非以所謂之功效成分為考量，亦即其試驗結果之生理功效應視為是整體產品各組成分的綜合結果，並非為其中的某一成分所導致。

六、試驗設計：

實驗應有對照控制組與試驗組，對照控制組得餵予『鈣質』含量為該試驗動物該年齡正常建議配方(應註明其資料來源或名稱)之 25-50% 的基礎飼料(因國人各年齡層的鈣平均攝取量都低於建議量之 50%)；試驗組餵予於基礎飼料中添加不同劑量試驗食品(得含鈣質)之飼料。試驗產品含有蛋白質或油脂時，其添加應取代(扣除)基礎飼料中等量之蛋白質或油脂為原則；但添加量不多($< 3\%$)時，得以額外的添加方式。

七、試驗組別：

除對照控制組外，建議應有 2~3 組含高低不同劑量的保健食品進行實驗，

其中必須包括有相當於人體建議攝取量之 1 倍劑量，其他劑量組得小於或大於 1 倍劑量。試驗樣品必須經由口服進行試驗，試驗後廠商得由所獲結果來推估該產品的適當建議攝取量。但若試驗樣品之主成分過去已有研究文獻、實驗報告或已有相似的產品已通過『健康食品』的認證等參考資料，可預估能顯示其生理功能的適當劑量；或該產品已上市而僅欲再確認其所原建議的劑量能顯示擬宣稱的生理功能時，實驗得採用單劑量進行試驗。

八、實驗動物與人體間試驗劑量之換算：

(一) 混合於飼料中給予方式：

試驗樣品直接混加於飼料中飼養時，動物與人體之間的換算原則為以設定每人每日攝取 500 克乾重食物為基準，而健康成人之受試產品建議攝取量（例如 10 克）除以 500 克之百分比（例如 2%），作為試驗樣品混加於動物飼料中 1 倍劑量的百分比（2%）；試驗時，得使用數種不同劑量進行試驗，以統計分析（建議使用 Duncan's Multiple Range Test）比較出最適劑量百分比後，500 g 乘以該百分比可得健康成人的建議每天攝取量。

(二) 以管灌給予方式：

如欲以管灌（gavage feeding）方式給予受試樣品時，一般的認知，身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性，明顯超過與其體重之相關性。然而，要精確測量其體表乃非常不易，而即使在同一物種（species）內之體表，其與體重間並沒有一簡單正確的公式可換算，且其關係又會隨著體重和體型的改變而與體表之關係係數呈現不規則的變異，因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性；或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法（Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers），而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量（/kg bw/d）的 6.2 倍作為

健康食品之骨質保健功效評估方法

大鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之試驗樣品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應附其明確之資料來源。

由於動物會隨著體重之增加而增加其攝食量，所以上述二項換算的方式，動物每天所獲得受試樣品的攝取量相差不大，因此都得採用。試驗組與對照組飼料必須含近似等量之蛋白質、脂肪等熱量來源。

九、飼養記錄：

實驗必須記錄每隻動物之每週體重改變與平均每日飼料攝取量，原則上各組間應無明顯 ($p > 0.05$) 的差異，本結果應為試驗報告之附錄。

十、試驗結果之分析與判斷：

必須選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組之各指標值變化與對照組比較是否具統計上之顯著改善 ($p < 0.05$)？且應統計比較各組間之每隻動物個別於實驗期前後各指標的變化值或比例。但當受試樣品組包括有不同劑量組時，必須進行組間的統計比較，建議先以 ANOVA (Analysis of Variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's Multiple Range Test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及比較該試驗樣品組與對照控制組的功效。然後加以綜合判斷該受試樣品是否具有能促進骨成長或減緩骨流失的有利因子之生理功效。由於骨骼生理的變化極為緩慢，有些例如骨密度等指標並不排除當統計分析組間之差異顯著性達 $p < 0.10$ (slightly significant) 時，得視為該受試樣品具有能促進骨成長或減緩骨流失的生理功效。

十一、動物試驗結果換算成為人體之建議劑量：

綜合動物試驗之統計結果求得最適劑量，如單位為飼料中之%時，則以同%為人類在一天中佔總飲食攝取量 (500 克乾重) 之%為 1 倍劑量，例如飼料中含 1%受試產品組獲得最佳綜合結果時，視同人類亦攝取 1% (5 克) 為最佳的 1 倍劑量。如實驗是採用每公斤體重 (/kg b.w.) 為單位時，則一律乘上 60 kg 作為成

人之 1 倍劑量。

十二、檢測項目與方法：

實驗動物模式於飼養期必須每週測量每隻動物的體重、身長(包括與不包括鼠尾的身長)，於犧牲後測股骨長度或股骨加脛骨長度。並必須下列(一)骨密度、(二)骨小樑測定、(三)海綿骨礦物質沉積速率評估、(四)生物力學分析及(五)OB、OC 代謝生化指標之測定等 5 項指標中選測至少任意 2 項指標，作為評估其具有增進骨骼成長或減緩骨流失之主要依據。

(一) 骨密度：

以雙能量 X 光吸收測定儀 (Dual energy X-ray Absorptiometer, DXA) 或新近之微小電腦斷層攝影分析 (micro-computerized tomography, Micro-CT, μ -CT。此儀器也可用來測定骨小樑數目) 檢測適當骨骼之骨密度(質量/體積)。這類儀器通常使用高低兩種能量之放射源，消除人體之軟組織干擾，並可同時測量體內脂肪和肌肉等。

測定時將實驗動物經麻醉或犧牲後，以俯臥姿勢固定，利用兩種不同能量的 DXA 測定儀掃瞄檢查部位，再以閃爍偵測器接收經過受測部位之 X-ray，然後以電腦分析數據，推算出受測部位之骨骼質量。此方法可測得脊椎骨 (spine)、股骨 (femur)、近端股骨 (proximal femur)、脛骨 (tibia) 或全身之骨量。於動物犧牲後，得以全屍同上述方法測定，亦得取下股骨、脛骨或其他適當之骨骼，測定其骨密度時，如已犧牲，取出欲測知骨骼後才測量。但如於犧牲前有測骨密度，而欲與犧牲前之測定值比較時，宜以全屍方式測量。

(二) 骨小樑測定：

以傳統之骨組織型態學等一般醫學或生理學認可之方法來進行股骨、脛骨及其他適當骨骼的切片，以觀察骨組織型態方式來分析與判斷。試驗方法大致為先將骨骼進行脫鈣或未脫鈣標本處理，並確實且完整的進行標本的固定，再使用材質硬度相當之包埋劑進行包埋，然後進行切片與染色，最後於顯微鏡下觀察，同時使用可計量之軟體，於生長板附近骨骺處選定特定範圍(每隻動物必須同一位置)進行骨組織型態學參數之計量。試驗亦可使用新近之 μ -CT 斷

層攝影法直接計算骨小樑體積 (trabecular bone volume; bone volume / tissue volume)、骨小樑厚度 (thickness of the trabeculae) 及其骨小樑數目。進行本指標評估試驗的試驗報告需詳細說明實驗方法與檢附足以判斷的切片照片或數據。

(三) 海綿骨礦物質沉積速率 (trabecular mineral apposition rate, MAR, $\mu\text{m}/\text{day}$) 評估：

成長期動物模式得測定其脛骨近側端 (proximal) 動態之參數作為海綿骨礦物質沉積速率之檢測。此可評估骨縱向成長速率和海綿骨礦物質沉積速率，藉以了解與骨生長有關的軟骨母細胞和原始造骨細胞 (osteoprogenitor cells) 的分化及骨重塑的進行。給予年輕動物一些保健食品、藥物或外來的刺激時，能觀察此指標的改變，而了解該保健食品、藥物或外來刺激對於骨生長的影響。在成熟大白鼠，軟骨母細胞及原始造骨細胞的分化有明顯的減少，會較不容易觀察。

測定方法通常使用紅色 Calcein 與黃綠色螢光 Xylenol orange 作為骨螢光標示劑 (fluorochrome)，以觀察礦物質化表面之沉積速率。於實驗飼養期結束前數週 (約在 6~12 週齡之間最適當，因在此時期之大鼠正處於發育快速成長期間，此二標線之差距較為明顯，容易觀察與計算)，由皮下先注射適量之 Calcein，過 2 週後再注射 Xylenol orange。動物犧牲後，將動物骨骼進行組織切片，並於螢光顯微鏡下觀察與計量。

(四) 生物力學分析：

使用骨應力測定儀進行左股骨 three-point bending 測定，兩端固定點各 5 mm，速度為 0.5 mm/min，紀錄力與距離，曲線圖斷面攝影後以影像分析軟體求出斷面面積。由此測試系統分析股骨得到骨力學分析的參數有最大負荷 (maximal load)，即紀錄的最大重量換算成『力』，其單位為牛頓 (N)。能量 (energy) 為紀錄圖曲線下的面積積分，單位為焦耳 (mJ)，即牛頓乘上距離 (圖一)。硬度 (stiffness) 以斜率表示，以最大負荷的牛頓除以距離 (N/mm)。壓力 (maximal stress, σ) 及楊性系數或扭力

(Young's modulus or Elastic modulus, E) 由下列公式計算出：

$$\text{壓力 } \sigma = FLc/4I$$

$$\text{扭力 } E = F/d \times L^3/48I$$

- E : elastic modulus
 F : applied load (N)
 c : distance from the center of mass (equal to $1/2b$)
 d : displacement (mm)
 L : span between the two support points of the bending fixture (mm) (如下圖 B)
 I : cross-sectional moment of inertia

$$I = \pi [ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3] / 64$$

a : mediolateral direction (圖一 C、D)

b : anteroposterior direction (圖一 C、D)

t : the average of the cortical thickness

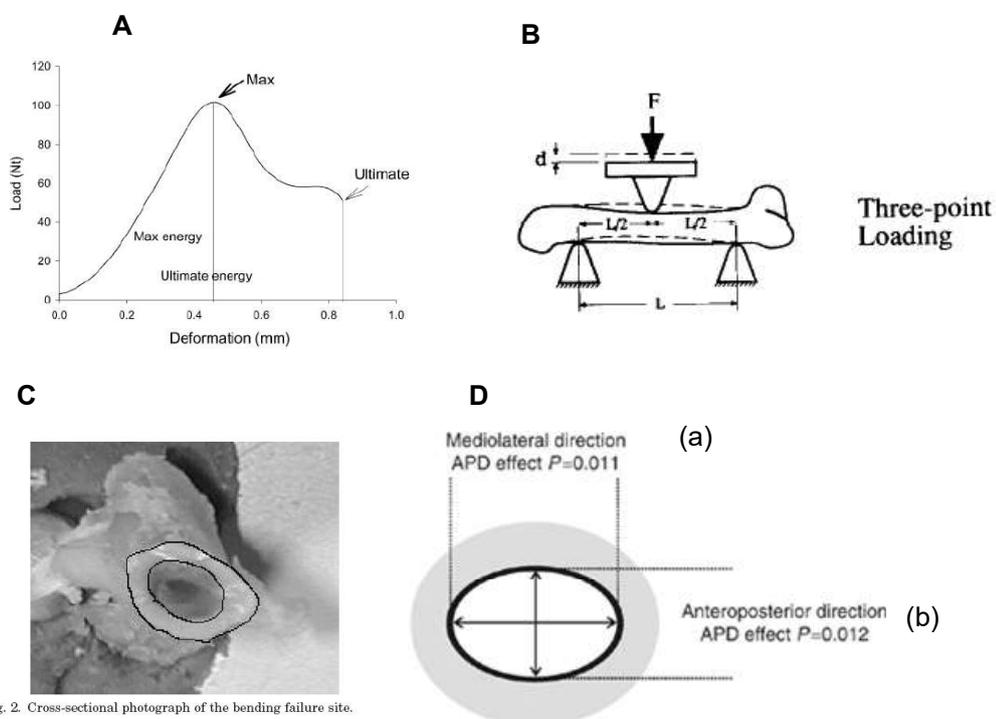


Fig. 2. Cross-sectional photograph of the bending failure site.

圖一 使用骨應力測定儀進行股骨 three-point bending 測定

(五) OB、OC 代謝生化指標之測定：

必須同時測定 OB 與 OC 活性的至少任一項指標。如受試產品能同時促進 OB 活性與抑制 OC 活性，則最能肯定該受試產品可促進骨骼之健康；但若該受試產品能促進 OB 活性或抑制 OC 活性，而對另一細胞無負面作用時，亦得視為『健康食品』。

1. OB 代謝之生化指標：

1.1. 骨源鹼性磷酸酶 (BAP)：

為一種骨內特有的醣蛋白，和骨內的礦化作用有關。測定時，得以適用於大鼠之 Alkphase-B Kit 進行 ELISA 分析。微量滴盤上附著有一層抗骨源鹼性磷酸酶之單株抗體 (Monoclonal anti-BAP antibody)，加入血清 BAP 與之形成專一性鍵結，再加入 p-Nitrophenyl phosphate (pNPP) 作為受質，BAP 水解 pNPP 使呈黃色反應。黃色越深表示血清中含有越多的骨源鹼性磷酸酶，於波長 405nm 下讀取的吸光值亦越大，將實驗組吸光值帶入標準曲線方程式，經換算獲得 BAP 濃度(U/L)。

1.2. 第一型原膠原蛋白之碳端胜肽 (procollagen-I C-terminal propeptide, PICP)：

合成原膠原蛋白之前，胜肽分解酶會將原膠原蛋白多餘的『碳端』胜肽切除，這些切除的原胜肽 PICP 產生速率與合成成熟之第一型膠原蛋白速率相當，因此可作為監控成熟的第一型膠原蛋白合成狀況之骨合成指標。

PICP 測定方法得採用適用於大鼠之 Prolagen-C Kit，利用雙抗體式酵素連結免疫分析法 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, sandwich ELISA) 進行測定血清中 PICP 之含量分析，Plate 上先塗上一層 anti-PICP antibody，將血清稀釋後加入 Plate 中，血清中之 PICP 與 Plate 上之 anti-PICP antibody 進行鍵結，接著逐步加入 rabbit anti-PICP 和 anti-rabbit antibody，最後加入受質 pNPP。Anti-rabbit antibody 上接有 alkaline phosphatase，可將 pNPP 水解呈色，於波長 405nm 下讀取吸

光值，血清中 PICP 含量與吸光值成正比。PICP 變化非常之快，進行此步驟需要快速檢測。

1.3. 骨鈣素 (osteocalcin) :

骨鈣素為骨內除了膠原蛋白之外，含量次高的化合物質。主要是由 OB 所生成，其含量與骨質的生成具有正相關性。骨鈣素之測定可使用免疫分析法，先使 biotinylated osteocalcin 連結固定在單株抗體的微量滴定盤 (streptavidin coated microtitre wells)，將滴定盤的洞 (wells) 倒空與清洗，再分別將標準液、控制組或試驗組的血清樣品滴定入適當的洞中，緊接加入 monoclonal antibody 之溶液，進行初步階段的培養 (Primary-incubation step)。然後將洞倒空與清洗，再加入複合有過氧化酶 (peroxidase) 之抗鼠免疫球蛋白 (anti-mouse immunoglobulins)，使與 monoclonal antibody 結合，進行第二階段的培養。第三次將洞倒空與清洗後加入 chromogenic 作用物質 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)，產生顏色反應，然後以硫酸使此顏色反應停止，最後於波長 450 nm 下讀取吸光值，樣品之 osteocalcin 含量與吸光值成反比，表示骨鈣素濃度越高，骨合成作用越好。

2. OC 代謝之生化指標 :

骨回收指標主要以反應 OC 活性表現及骨基質分解相關產物，包括尿中鈣、尿中羥基脯胺酸 (urinary hydroxyproline)、hydroxylysine glycosides、整體或游離型式的 pyridinoline cross-links、NTx 和 CTx 等。TRAP 是唯一的非膠原蛋白分解產物的骨分解指標。本評估方法推薦以第一型膠原蛋白之氮端胜肽 (cross link N-telopeptide, NTx) 作為 OC 代謝之生化指標。

2.1. 第一型膠原蛋白之氮端胜肽 (cross Link N-telopeptide, NTx) :

測定方法乃根據競爭-抑制型酵素連結免疫分析法 (competitive-inhibition ELISA) 之原理測定血清中 NTx 含量。試驗得採用市售適用於大鼠之測定血清 NTx Kit，方法為將樣品或標準品加入

先附著有一層已吸附好之 NTx 抗體的微量滴盤中，於室溫培養 5 分鐘，其會與血清中的 NTx 競爭已經標定好的山葵過氧化酶（horseradish peroxidase）的單株抗體的結合位置。因此，血清中 NTx 和與滴定盤中上 NTx 結合抗體的量成反比，最後於 450 nm 測定每個 microwell 的吸光值，再予與標準曲線比較，算出其濃度。吸光值越大表示血清中 NTx 含量越少。

2.2. 吡啶二酚胺（pyridinoline, Pyd）：

使用大鼠 Serum Pyd Kit 檢測分析，測定方法乃根據競爭型酵素連結免疫分析法（Competitive ELISA）之原理測得血清中 Pyd 含量。測定時，陸續將血清、抗 Pyd 之抗體（Rabbit anti-Pyd antibody）加入先附著有一層牛抗 Pyd 之抗體（Bovine anti-Pyd antibody）的微量滴盤中。血清樣品中之 Pyd 會和 rabbit anti-Pyd antibody 相互競爭與 bovine anti-Pyd antibody 的結合位置。系統主要用於偵測 bovine anti-Pyd antibody 之含量，最後於波長 405 nm 下讀取吸光值。將吸光值帶入標準曲線方程式，則可算出 Pyd 含量。吸光值越大表示血清中 Pyd 含量越少。

3. 其他指標：

亦可測試其他 OB 或 OC 的其他適當之代謝生化指標，但須檢附資料以支持該指標的適當性。

（六）參考指標：

試驗若採用成長期動物時，得測定骨皮質厚度或骨長等骨發育指標或其他任何生理學或醫學認同能作為骨發育或骨流失的適當指標（須附參考文獻）作為參考，以增強支持受試產品之功效。實驗亦可從動物分離出 OB 或 OC 來進行體外細胞培養試驗，以作為活體試驗前之篩檢受試產品功效之預先試驗（pre-test），且得為本功效評估之參考。但進行此類體外細胞培養試驗必須有適當的對照組，尤其是進行『抑制』細胞活性之實驗。否則，受試物或任何試劑濃度過高，或細胞培養條件不佳時，都可能導致細胞萎縮或凋亡，而誤以為該

受試物有抑制 OC 活性之假象。

十三、宣稱：

實驗結果若能證實 1-5 倍劑量（得以 1 倍劑量作為人體之建議劑量）的受試產品能對骨骼的（一）骨密度、（二）骨小樑測定、（三）海綿骨礦物質沉積速率評估、（四）生物力學分析及（五）OB、OC 代謝生化指標之測定等 5 項指標中測定指標之任一在統計上明顯（ $p < 0.05$ ）比不含受試產品之對照控制組較佳；而其中至少另有一項測定指標（得含上述的（五）-3「其他指標」）略優於（ $p < 0.10$ ）對照控制組時，凡使用成長期動物模式進行試驗者得宣稱：經動物實驗證實攝取本產品可能『有助於骨成長』；而使用更年期卵巢切除動物模式進行試驗者得宣稱：經動物實驗證實攝取本產品可能『有助於延緩骨流失』，但同一產品分別進行成長期與更年期卵巢切除動物模式並通過得宣稱上述之二項生理功效時，得另加宣稱：經動物實驗證實攝取本產品可能『有助於減少發生骨質疏鬆之危險因子』。

參、人體試驗模式

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與骨骼生理相關之專業背景與研究經驗或著作。試驗必須有相關專長之醫師參與，且事先須通過執行單位或相關之人體試驗倫理委員會（IRB）之核准才得開始進行試驗，並遵循衛生機關對健康食品人體實驗有關之相關規定。

實驗得選擇下列「鈣質生物利用率測定」或「骨質變化測定」之一即可，能同時進行二者更佳。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

一、鈣質生物利用率測定：

（一）受試者：

受試者宜為健康之成年人，性別不拘，但女性受試者必須非懷孕、非授乳者。本試驗採自體比較的方式，以減少個人之生理誤差，因此每位受試者都必須進行單盲或雙盲交叉試驗，分別單次攝取含等量鈣質的受試食品或對照碳酸鈣 (CaCO_3) 之鈣吸收測試。兩次交叉受試時間須至少間隔 1 週，實驗前與實驗期間受試者之飲食應盡可能穩定維持其原飲食習慣，且應避免攝取含高量鈣、維生素 D 或草酸 (oxalate)、植酸 (phytate) 等顯著影響鈣吸收之食品。完成試驗人數至少 30 人以上 (包括「受試食品」與「碳酸鈣對照樣品」試驗，共 60 人次以上)。

(二) 實驗方法：

試驗時，建議將受試者逢機分為 A、B 二組，人數各半，實驗前必須先空腹 12 小時以上，但喝充分的水。實驗時，A 組一次服用劑量為每天建議攝食量之 $1/4 \sim 1/2$ 倍 (單次測定理想劑量為 250~500 mg) 之受試食品樣品；B 組則攝取等鈣量之碳酸鈣，服用前後都應喝充足之蒸餾水或去離子水。服用樣品前取約 5 mL 之血液與 10 mL 之尿液樣品，然後於服用樣品之 2 與 4 小時 (能有 6 小時更佳，但如此，受試者須空腹 > 18 小時) 分別取同量之血液與尿液樣品，分別測定 0、2、4、(6) 小時之血清 Ca 與尿液 Ca/Creatinine 比率，以及 0 和 4 (或 6) 小時之血清副甲狀腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 濃度。完成第一次攝食試驗再相隔 ≥ 7 天之後進行交叉之第二次試驗，除 A、B 所攝取的鈣樣品對調外，其餘均與第一次攝食試驗相同。

二次試驗後，將攝取相同樣品之測定結果合併成同一組，進行統計比較 2、4、(6) 小時與 0 小時之基礎線值之變化量分析，若在 2 或 4 或 (6) 小時之任一時間點或濃度變化曲線下之積分面積「受試樣品組」明顯比「對照碳酸鈣組」能獲得明顯較高的血清 Ca 濃度增加量與尿液 Ca/Creatinine 比率，或較低的血清 PTH，均表示受試食品所含鈣質之吸收較一般鈣質來源優良，對預防骨質疏鬆症可能有幫助。

因本測定項目中需測定血液中之鈣質濃度，故本評估方法之血液樣本必須使用自然凝固的血清（serum）來作比較，避免使用以加入 EDTA 等會干擾血鈣而獲得之血漿（plasma）來測定。

（三）數據判斷、建議劑量及宣稱：

本試驗結果，建議以 paired student's t-test 或適當之統計方法比較「受試產品試驗組」與「碳酸鈣組」間差異的顯著性分析， $p < 0.05$ 為有顯著性差異。由於當鈣質攝取量相等，而吸收較差，血清鈣質濃度呈現偏低時，鈣質平衡機制會處於由骨骼流向血液之回收狀態，不利於骨密度的增加或維持；相反地，當鈣質吸收較佳，血清鈣質濃度略偏高時，有利於鈣質平衡機制較有機會處於由血液流向骨骼之存入狀態，以致有利於骨密度的增加或維持。然而，血鈣濃度偏高並不等於一定能將血鈣存入骨骼，因此僅執行本試驗，且證實該產品（非單考慮其所含之鈣質，乃以整體產品為考量）具有較佳之鈣質吸收率時，得視為健康食品。本試驗所使用之「試驗劑量」與產品的「建議劑量」完全無關，其適當之建議劑量為每天 600~1,000 mg Ca，但宜為產品單位（即每瓶、罐、盒或粒等）之整數倍數。可宣稱：『本食品所含鈣質之生物利用率較一般鈣質來源優良』；但原則上不可直接宣稱對『骨密度或骨代謝』有何功效。

二、骨質變化測定：

（一）試驗對象：

實驗得視受試產品的特性而篩檢所需適當志願正常健康受試者。通常探討受試產品對骨骼發育之影響時，宜選用『成長期』之兒童或青春期青少年，但除非特別需要，應盡量排除 6 歲以下之兒童為受試者；探討受試產品對骨流失之預防或改善功效時，宜篩選適當之『更年期』婦女（以剛停經或停經後未超過 10 年者為佳）或 > 60 歲『高齡』受試者，但本評估試驗不排除得使用其他年齡或生理狀況特殊族群之受試者。

通常使用相同性別、相近年齡層與條件的受試者可較易獲得明確之結果。試驗前必須讓志願者充分瞭解本實驗內容，並徵得其同意與簽寫『試驗志願

單』；凡未滿 18 歲之受試者，必須事先徵得其父母或監護人之同意與簽寫同意單。

(二) 試驗設計與方式：

試驗應包括有受試樣品試驗組與安慰劑控制組，採單盲（受試者不知受試樣品為何）或雙盲（受試者與執行者都不知受試樣品為何）之自體與組間比較試驗。

因人體試驗的基本規範必須讓受試者清楚試驗的目的（不包括其所攝取的樣品是什麼成分與其功效），可能難免產生「安慰劑效應」(placebo effects) 之心理效果，因此實驗應對受試者盡可能加以心理建設，並要求受試者盡可能維持原有之生活形態（但排除明顯之干擾因子），以降低可能之「安慰劑效應」。並建議盡可能採用雙盲或單盲之「自身交叉對照模式」，使每一位受試者都會攝取到「安慰劑」與「受試樣品」，因此可盡可能地加以校正。

當在技術上無法製造與受試樣品外觀與口味等都極相似的「安慰劑」(例如天然食品)時，得使用型態相近（例如「柳橙汁」vs「蘋果汁」），受試者完全不知那一樣品有效或甚至以為二種都有效的要件下，選擇確定不具欲評估之功效的「對照樣品」作為「安慰劑」。

所有之受試者於試驗期間必須穩定維持其原飲食與運動等生活習慣，盡可能避免額外自行攝取任何干擾骨骼代謝之影響因子，持續至實驗結束。並盡可能記錄其有較明顯變化的部分，供參考。

篩選出的受試者於實驗開始與結束時，應檢測所有指標之『起始值』與『結束值』，實驗進行期間亦得檢測相同的指標，以瞭解試驗期間之變化情形供參考，但非必需。試驗結果應以 student paired t-test 比較每位受試者試驗前後的變化，以及試驗組與安慰劑控制組之間的差異（骨骼的測量指標容易受時間因子的影響）；但有二劑量以上之試驗組時，應使用 Duncan's Multiple Range Test，以比較出其最適劑量。

(三) 受試人數與試驗期限：

人數視實驗特性與設計而定，由於人體實驗之飲食與生活形態控制不易，

變數較大，每實驗組完成人數必須 ≥ 15 人。試驗期限之長短視受試產品之特質與所使用的評估指標性質之所需時間而定，通常成長期模式應 $\geq 8\sim 12$ 週；更年期模式應 $\geq 16\sim 24$ 週。

(四) 試驗材料與劑量：

試驗劑量必須包括上市或預備上市產品之1倍建議劑量，且必須都在安全劑量範圍內。試驗樣品之給予得視樣品之特質而採『額外補充』或『取代部分正餐』之方式皆可。『功效成分』以整體產品為考量，得為某一明確化學成分為主，也得為幾項成分或食材之複方產品。該項主成分或配方對骨代謝之影響機制得在科學上尚不明白，但必須確定在該劑量長期服用應無明顯之安全顧慮。

(五) 測定指標：

無論是成長期、更年期或其他模式，骨骼健康的變化均建議應測量其骨密度、身高、體重，以及OB、OC代謝的生化指標等變化，並盡可能記錄每位受試者之飲食與生活形態之大致變化供參考。

(六) 檢測方法：

1. 骨密度測定方法：

本測定指標採用腰椎骨 (lumbar spine) 和股骨頸 (femoral neck) 骨密度之 T-score 以及 Age-match 之 "Z-score"。世界衛生組織 (WHO) 的國際參考標準以 T-score ≤ -2.5 時可診斷為骨質疏鬆症。骨密度之測定，以中軸型的 DXA 為準，且應測量腰椎與髖骨，若兩處之一不能測定時，則可用前臂橈骨 1/3 處之測定取代。

1.1. 腰椎密度：以測定 L1-L4 為基準。

1.2. 髖骨與/或股骨頸密度：

同時測量二側 (有困難時，得僅測任何同一側) 之髖骨與/或股骨頸骨密度，而分別比較左右單一側，以及雙側骨密度平均 T 值比作為診斷骨密度變化之依據。但不應使用華德氏區 (Ward's area) 或股骨大轉子 (trochanter) 作為診斷依據。

1.3. 前臂橈骨密度：

前臂骨判讀區間，僅可使用非慣用手的橈骨 33% 長度處（有時候稱為 1/3 橈骨）作為診斷，其他前臂區均不建議使用（中華民國骨質疏松症學會）。

1.4. 以骨密度作為評估指標的困難：

骨密度變化緩慢，影響因子眾多，而飲食對骨密度的影響應屬很重要，但很緩慢的影響因子之一，因此，測定骨密度變化並非評估食品因子對骨代謝影響之敏感指標。本測定僅要求攝取受試樣品之試驗組與攝取安慰劑之控制組比較時，其改善效果在統計上達 $p < 0.10$ 顯著性時，即認為該受試樣品具有預防或改善骨質密度之功效。

2. OB、OC 代謝生化指標之測定：

進行本試驗必須有適當對照組，得使用同一市售適合人類之試劑組（test kit）來測定。試驗必須同時測定 OB 與 OC 活性的至少任二項指標。如受試產品能同時促進 OB 活性與抑制 OC 活性，則最能肯定該受試產品可促進骨骼之健康；但若該受試產品能促進 OB 活性或抑制 OC 活性，而對另一細胞無負面作用時，亦得視為『健康食品』。

2.1. OB 代謝之生化指標：

2.1.1. 骨源鹼性磷酸酶（BAP）：

為一種骨內特有的醣蛋白，和骨內的礦化作用有關。測定時，得以適合人類之 Alkphase-B kit 進行 ELISA 分析。微量滴盤上附著有一層抗骨源鹼性磷酸酶之單株抗體（monoclonal anti-BAP antibody），加入血清 BAP 與之形成專一性鍵結，再加入 p-Nitrophenyl phosphate（pNPP）作為受質，BAP 水解 pNPP 使呈黃色反應。黃色越深表示血清中含有越多的骨源鹼性磷酸酶，於波長 405 nm 下讀取的吸光值亦越大，將實驗組吸光值帶入標準曲線方程式，經換算獲得 BAP 濃度（U/L）。

2.1.2. 第一型原膠原蛋白之碳端胜肽（procollagen-I C-terminal propeptide, PICP）：

合成原膠原蛋白之前，胜肽分解酶會將原膠原蛋白多餘的『碳端』

胜肽切除，這些切除的原胜肽 PICP 產生速率與合成成熟之第一型膠原蛋白速率相當，因此可作為監控成熟的第一型膠原蛋白合成狀況之骨合成指標。

PICP 測定方法得採用適合人體之 Prolagen-C Kit，利用雙抗體式酵素連結免疫分析法 (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, sandwich ELISA) 進行測定血清中 PICP 之含量分析，Plate 上先塗上一層 anti-PICP antibody，將血清稀釋後加入 Plate 中，血清中之 PICP 與 Plate 上之 anti-PICP antibody 進行鍵結，接著逐步加入 rabbit anti-PICP 和 anti-rabbit antibody，最後加入受質 pNPP。Anti-rabbit antibody 上接有 alkaline phosphatase，可將 pNPP 水解呈色，於波長 405 nm 下讀取吸光值，血清中 PICP 含量與吸光值成正比。PICP 變化非常之快，進行此步驟需要快速檢測。

2.1.3. 骨鈣素 (osteocalcin)：

骨鈣素為骨內除了膠原蛋白之外，含量次高的化合物質。主要是由 OB 所生成，其含量與骨質的生成具有正相關性。骨鈣素之測定可使用免疫分析法，先使 biotinylated osteocalcin 連結固定在單株抗體的微量滴定盤 (streptavidincoated microtitre wells)，將滴定盤的洞 (wells) 倒空與清洗，再分別將標準液、控制組或試驗組的血清樣品滴定入適當的洞中，緊接加入 monoclonal antibody 之溶液，進行初步階段的培養 (primary-incubation step)。然後將洞倒空與清洗，再加入複合有過氧化酶 (peroxidase) 之抗鼠免疫球蛋白 (anti-mouse immunoglobulins)，使與 monoclonal antibody 結合，進行第二階段的培養。第三次將洞倒空與清洗後加入 chromogenic 作用物質(TMB)，產生顏色反應，然後以硫酸使此顏色反應停止，最後於波長 450 nm 下讀取吸光值，樣品之 osteocalcin 含量與吸光值成反比，表示骨鈣素濃度越高，骨合成作用越好。

2.2. OC 代謝之生化指標：

骨回收指標主要以反應 OC 活性表現及骨基質分解相關產物，包括尿中鈣、尿中羥基脯胺酸（urinary hydroxyproline）、hydroxylysine glycosides、整體或游離型式的 pyridinoline cross-links、NTx 和 CTx 等；TRAP 是唯一的非膠原蛋白分解產物的骨分解指標。本評估方法推薦以第一型膠原蛋白之氮端胜肽（cross link N-telopeptide, NTx）作為 OC 代謝之生化指標。

2.2.1. 第一型膠原蛋白之氮端胜肽（cross Link N-telopeptide, NTx）：

測定方法乃根據競爭-抑制型酵素連結免疫分析法（competitive-inhibition ELISA）之原理測定血清中 NTx 含量。試驗得使用適合檢測人類血清 NTx 之市售檢驗試劑，實驗先將樣品加入先附著有一層已吸附好之 NTx 抗體的微量滴盤中，於室溫培養 5 分鐘，其會與血清中的 NTx 競爭已經標定好的山葵過氧化酶（horseradish peroxidase）的單株抗體之結合位置。因此，血清中 NTx 和與滴定盤中上 NTx 結合抗體的量會成反比，最後於 450 nm 測定每個 microwell 的吸光值，再予與標準曲線比較，算出其濃度。吸光值越大表示血清中 NTx 含量越少。

2.2.2. 吡啶二酚胺（pyridinoline, Pyd）：

使用人類 Serum Pyd Kit 檢測分析，測定方法乃根據競爭型酵素連結免疫分析法（competitive ELISA）之原理測得血清中 Pyd 含量。測定時，陸續將血清、抗 Pyd 之抗體（rabbit anti-Pyd antibody）加入先附著有一層牛抗 Pyd 之抗體（bovine anti-Pyd antibody）的微量滴盤中。血清樣品中之 Pyd 會和 rabbit anti-Pyd antibody 相互競爭與 bovine anti-Pyd antibody 的結合位置。系統主要用於偵測 bovine anti-Pyd antibody 之含量，最後於波長 405 nm 下讀取吸光值。將吸光值帶入標準曲線方程式，則可算出 Pyd 含量。吸光值越大表示血清中 Pyd 含量越少。

2.3. 其他指標：

亦可測試其他 OB 或 OC 的其他適當之代謝生化指標，但須檢附資料以支持該指標的適當性。

(七) 參考指標：

試驗得加以檢測任何生理學或醫學認同能作為骨發育或骨流失的適當指標（須附參考文獻）作為參考，以增強支持受試產品之功效。實驗亦可先從動物分離出 OB 或 OC 來進行體外細胞培養試驗，以作為活體試驗前之篩檢受試產品功效之預先試驗（pre-test），且得為本功效評估之參考。但進行此類體外細胞培養試驗必須有適當的對照組，尤其是進行『抑制』細胞活性之實驗。

(八) 數據處理和結果判斷：

選擇適當的生物統計方法分析，由於骨骼之變化緩慢、測定之誤差值大、影響因子多又強，因此本評估方法在統計上的認定採較寬鬆的 $p < 0.10$ (slightly significant) 為標準（對骨骼而言，已有很大影響）。實驗結果除受試產品試驗組與安慰劑對照組相比較外，更主要是自身受試期間與結束時的數據與起始數據相比較 $[(\text{結束值}) - (\text{起始值})]$ 或 $[(\text{結束值}) - (\text{起始值})] / (\text{起始值})$ ，以 paired student's t-test 或適當之統計方法比較組內試驗「前」與「後」，以及「受試產品試驗組」與「安慰劑控制組」組間差異的顯著性分析，比較是否具有統計上之顯著 ($p < 0.05$) 或略微 ($p < 0.10$) 改善。但當試驗樣品組包括有不同劑量組或有正、負控制組時，必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA (Analysis of Variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's Multiple Range Test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及該試驗樣品與正、負對照樣品功效的比較。

由於除了「負重運動」等非飲食因子會很明顯骨代謝之外，骨本身在不同年齡層本來就會有明顯的「增加骨量或骨密度」（例如生長期）或「降低骨量或骨密度」（例如更年期），因此本人體試驗的統計分析之判斷重點不在試驗前後的變化值（但為重要參考），而乃是「試驗組」與「控制組」的比較；亦即如果「試驗組」的骨新陳代謝呈現「負平衡」時，並不等於「試驗樣品」不具延緩骨質流失的功效。因此應綜合比較各臨床指標之試驗結果，判定該受試物是否

具有增進骨骼成長、預防骨流失或有助於減少發生骨質疏鬆之危險因子之功效。

三、宣稱：

進行骨質變化指標測定之人體試驗，其實驗結果若能證實受試產品試驗組的骨密度在統計上略 ($p < 0.10$) 優於對照控制組，或有至少一項之 OB 或 OC 的代謝生化指標明顯 ($p < 0.05$) 優於對照控制組時〔還有其他指標略 ($p < 0.10$) 優於對照控制組更佳〕，凡使用『成長期』模式進行試驗者得宣稱：攝取本產品可能『有助於骨成長』；而使用『更年期或高齡』模式進行試驗者得宣稱：攝取本產品可能『有助於延緩骨流失』，但同一產品分別進行成長期與更年期模式，並通過得宣稱上述之二項生理功效時，得另加宣稱：攝取本產品可能『有助於減少發生骨質疏鬆之危險因子』。試驗雖使用同一性別或年齡層之受試者，但於『宣稱』或『警語』可不必加註僅侷限於某一性別或年齡層。

肆、保健功效之宣稱

各不同評估試驗結果的判定依各評估方法之說明，如結果能獲得具有明確功效之認定，得使用下列之宣稱：

- 一、按參、一之鈣質生物利用率測定之人體試驗，得宣稱：『本食品所含鈣質之生物利用率較一般鈣質來源優良』。
- 二、直接進行與骨質相關之動物評估試驗，凡使用成長期動物模式進行試驗者得宣稱：『經動物實驗證實攝取本產品可能有助於骨成長』；而使用更年期卵巢切除動物模式進行試驗者得宣稱：『經動物實驗證實攝取本產品可能有助於延緩骨流失』，但同一產品分別進行成長期與更年期卵巢切除動物模式並通過得宣稱上述之二項生理功效時，得另加宣稱：『經動物實驗證實攝取本產品可能有助於減少發生骨質疏鬆之危險因子』。
- 三、凡使用『成長期』人體試驗模式進行評估者得宣稱：攝取本產品可能『有助於骨成長』；而使用『更年期或高齡』人體試驗模式進行評估者得宣稱：攝取本產品可能『有助於延緩骨流失』，但同一產品分別進行成長期與更年期

健康食品之骨質保健功效評估方法

模式，並通過得宣稱上述之二項生理功效時，得另加宣稱：攝取本產品可能『有助於減少發生骨質疏鬆之危險因子』。