

国家市场监督管理总局
保健食品产品技术要求

国食健注G20200065

乐龄益康牌雨生红球藻葡萄籽软胶囊

- 【原料】 葡萄籽提取物、雨生红球藻提取物
- 【辅料】 红花籽油、明胶、纯化水、甘油、蜂蜡、二氧化钛、胭脂红
- 【生产工艺】 本品经混合、均质、压丸、干燥、包装等主要工艺制成。
- 【直接接触产品包装材料种类、名称及标准】
口服固体药用高密度聚乙烯瓶应符合YBB00122002的规定。
- 【感官要求】 应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	指 标
色泽	囊皮呈棕红色，内容物呈深红色
滋味、气味	具本品固有的滋味、气味，无异味
性状	软胶囊，完整光洁；内容物为油状物
杂质	无正常视力可见外来异物

【鉴别】 无

【理化指标】 应符合表2的规定。

表2 理化指标

项 目	指 标	检测方法
灰分，%	≤3.0	GB 5009.4
崩解时限，min	≤60	《中华人民共和国药典》
酸价，mgKOH/g	≤6.0	GB 5009.229
过氧化值，meq/kg	≤8.0	GB 5009.227

铅（以Pb计），mg/kg	≤2.0	GB 5009.12
总砷(以As计)，mg/kg	≤1.0	GB 5009.11
总汞(以Hg计)，mg/kg	≤0.3	GB 5009.17
六六六，mg/kg	≤0.1	GB/T 5009.19
滴滴涕，mg/kg	≤0.1	GB/T 5009.19
胭脂红，g/kg	≤0.3	GB 5009.35
黄曲霉毒素B ₁ ，μg/kg	≤5.0	GB 5009.22

【微生物指标】应符合表3的规定。

表3 微生物指标

项 目	指 标	检测方法
菌落总数，CFU/g	≤30000	GB 4789.2
大肠菌群，MPN/g	≤0.92	GB 4789.3 “MPN计数法”
霉菌和酵母，CFU/g	≤50	GB 4789.15
沙门氏菌	≤0/25g	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌	≤0/25g	GB 4789.10

【标志性成分含量测定】应符合表4的规定。

表4 标志性成分含量测定

项 目	指 标	检测方法
原花青素，g/100g	≥11	1 原花青素的测定
虾青素，mg/100g	≥250	2 虾青素的测定

1 原花青素的测定

1.1 原理：原花青素是含有儿茶素和表儿茶素单元的聚合物。原花青素本身无色，但经过用热酸处理后，可以生成深红色的花青素离子。本法用分光光度法测定原花青素在水解过程中生成的花青素离子。计算试样中原花青素含量。

1.2 试剂

1.2.1 甲醇：分析纯。

1.2.2 正丁醇：分析纯。

1.2.3 盐酸：分析纯。

1.2.4 硫酸铁铵：分析纯。

1.2.5 硫酸铁铵溶液：用浓度为2mol/L盐酸配成2%（w/v）的溶液。

1.2.6 原花青素标准品：纯度95%。

1.3 仪器

1.3.1 分光光度计。

1.3.2 回流装置。

1.4 分析步骤

1.4.1 试样的制备：称取50mg试样，置于小烧杯中，用20mL甲醇分数次搅拌，将原花青素洗入50mL容量瓶中，直至甲醇提取液无色，加甲醇至刻度，摇匀。

1.4.2 标准曲线：称取对照品原花青素10.0mg溶于10mL甲醇中，分别精密量取0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5mL于10mL容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，备用。将正丁醇与盐酸按95:5的体积比混合后，取出6mL置于具塞锥形瓶中，再加入0.2mL硫酸铁铵溶液和1mL上述浓度标准液，混匀，置沸水浴回流，精确加热40min后，立即置冰水中冷却，在加热完毕15min后，于546nm波长处测吸光度。

1.4.3 试样的测定：将正丁醇与盐酸按95:5的体积比混合后，取出6mL置于具塞锥形瓶中，再加入0.2mL硫酸铁铵溶液和1mL试液溶液，混匀，置沸水浴回流，精确加热40min后，立即置冰水中冷却，在加热完毕15min后，于546nm波长处测吸光度，由标准曲线计算试样中原花青素的含量。

1.5 结果计算：

$$X(\%) = \frac{m_1 \times v \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \times 100$$

式中：

X—试样中原花青素的百分含量，g/100g；

m_1 —反应混合物中原花青素的量， μg ；

v—待测样液的总体积，mL；

m—试样的质量，mg。

1.6 相对标准偏差：<10%。

2 虾青素的测定

2.1 原理：采用丙酮对提取物中游离虾青素及虾青素酯进行提取，提取液以丙酮作为空白对照，通过吸光度值估算总类胡萝卜素及虾青素含量。再将一定量的溶液经胆甾醇酯酶水解，使溶液中虾青素酯水解为游离虾青素，经HPLC液相色谱仪测定准确计算总虾青素含量。

2.2 试剂

常用试剂为分析纯，高效液相色谱仪流动相为色谱纯。

2.2.1 无水硫酸钠：分析纯。

2.2.2 十水硫酸钠：分析纯。

2.2.3 石油醚（60~90℃）：分析纯。

2.2.4 甲醇：色谱纯。

2.2.5 氯仿：甲醇（50：50）。

2.2.6 丙酮：分析纯，色谱纯。

2.2.7 荧光假单胞菌中提取的胆甾醇酯酶（Sigma C-9281）。

2.2.8 虾青素标准品：含量95%。

2.2.9 Tris-HCL（0.05M pH7.0）：准确称取Tris粉6.057g溶解于800mL去离子水中，用稀盐酸调pH值至7.0，将调好pH值的Tris-HCL转移至1000mL容量瓶中，用纯化水定容至刻度摇匀即得。

2.2.10 胆甾醇酯酶溶液（20U/mL）：取100U/瓶的胆甾醇酯酶，用Tris-HCL（0.05M pH7.0）溶解并转移至5mL容量瓶中，加Tris-HCL稀释至刻度，摇匀即得。配制好的胆甾醇酯酶溶液，根据每次使用情况采用微量移液器分装入适当避光容器中，通常以0.4mL或0.6mL为单位进行分装，密封于-20℃保存，在规定包装及存储条件下，有效期为6个月。

2.3 仪器

2.3.1 分光光度计。

2.3.2 高效液相色谱仪。

2.4 分析步骤

以下步骤需要在避光条件下进行，试验环境温度不宜超过25℃。

2.4.1 色谱条件

- 2.4.1.1 色谱柱：YMC-Pack ODS-A ， 250×4.6mm ， L.D S-5μm。
- 2.4.1.2 流动相：其中以甲醇为流动相A、以水为流动相B、以乙酸乙酯为流动相C，按表1规定进行梯度洗脱。
- 2.4.1.3 流速：1.2mL/min。
- 2.4.1.4 波长：474nm。
- 2.4.1.5 柱温：20℃。

表1 梯度洗脱

HPLC gradient protocol					
Time(min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B	%C	Conditions
0	1.2	82	8	10	Injection
20	1.2	29	1	70	Linear gradient
22	1.2	29	1	70	EquiLibration
24	1.2	82	8	10	Linear gradient
30	1.2	82	8	10	EquiLibration

- 2.4.2 供试品溶液制备
- 2.4.2.1 样品溶液①：称提取物约20mg精密称定。置于25mL容量瓶中，加少量丙酮轻轻振摇使溶解，加丙酮定容至刻度，摇匀。精密吸取1mL至50mL容量瓶中，用丙酮定容至刻度，摇匀即得。
- 2.4.2.2 样品溶液②：精密量取2.4.2.1所制得样品溶液①1.5mL，置于10mL离心管中，加Tris-HCL1.0mL，混匀，置37℃水浴中孵育2min，加100μL胆甾醇酯酶溶液，混匀，充氮气15s排除离心管空气，用自封口膜将离心管口密封。于37℃水浴中孵育45～50min，每15min摇动一次离心管。加2.0mL石油醚、0.5g十水硫酸钠，强力涡流30s，离心5min（3500rpm）。移取石油醚层至盛有1.0g无水硫酸钠的离心管中。再次加入1.0mL石油醚重复提取操作。合并石油醚层至盛有1.0g无水硫酸钠的离心管中，摇匀后静置，移取石油醚层至另一离心管，再用2mL石油醚清洗盛无水硫酸钠离心管，将石油醚层移入同一离心管，用氮气吹干，轻轻摇动或旋转离心管至样品完全干燥。用1.5mL氯仿-甲醇（50:50）液稀释，超声使混合均匀，离心5min（3500rpm），0.45μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。
- 2.4.3 标准品溶液制备：精密称取虾青素标准品7.5mg置于25mL棕色容量瓶中，用少量氯仿溶解，加丙酮定容至刻度，摇匀，制得标准品储备液。精密量取1mL移至100mL容量瓶中，加丙酮定容至刻度，摇匀，即得。
- 2.4.4 测定及计算
- 2.4.4.1 分光光度法：以丙酮溶液作空白，用分光光度计于474nm处读取样品溶液①吸光度，按下式估算总类胡萝卜素和虾青素含量。

$$\text{总类胡萝卜素提取物 (mg)} = \frac{\text{Abs max} \times V \text{ (mL) 丙酮}}{210}$$

$$\text{总类胡萝卜素 (\%)} = \frac{\text{总类胡萝卜素提取物 (mg)} \times 100\%}{\text{样品重量 (mg)}}$$

$$\text{虾青素百分比 (质量)} = \frac{\text{总类胡萝卜素提取物 (mg)} \times 92\%}{\hspace{10em}}$$

样品重量 (mg)

注：210是在(1mg/mL)类胡萝卜素在丙酮置于1cm的比色皿中，波长为474时的吸光度

2.4.4.2 高效液相色谱法

响应因子：精密吸取标准液20μL，注入液相色谱仪，测定。以峰面积对虾青素浓度计算得响应因子。

样品测定：精密吸取供试品溶液20μL，注入液相色谱仪，测定。通过标准溶液响应因子按下式准确计算虾青素含量。

$$RF\text{-虾青素} = [P(\text{trans-asta}) + 1.2 P(9\text{-cis}) + 1.6 P(13\text{-cis})]/C$$

P =峰面积 (mV. s.)

C =虾青素浓度 (μg/mL)

注：因为9-cis、13-cis虾青素λmax不是474nm（其中13-cis虾青素λmax为368.8nm）。常数1.2、1.6分别为9-cis、13-cis虾青素在测定条件下与全反式虾青素响应因子差异校正系数。

2.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

【装量或重量差异指标/净含量及允许负偏差指标】

应符合《中华人民共和国药典》中“制剂通则”项下“胶囊剂”的规定。

【原辅料质量要求】

1. 葡萄籽提取物

项 目	指 标
来源	葡萄籽（拉丁名： <i>Vitis vinifera L.</i> ） 应符合相关食品安全国家标准的规定
制法	经粉碎、提取（8倍量80%食用乙醇回流提取3次，每次2h）、浓缩、萃取（乙酸乙酯4次）、回收乙酸乙酯、聚酰胺上柱层析（4~6倍量）、洗脱（70%食用乙醇）、浓缩、干燥（60℃，0.06MPa）、粉碎、过筛等主要工艺制成
得率，%	约5
感官要求	红棕色粉末
粒度，目	100
原花青素，%	≥95.0
水分，%	≤5.0
灰分，%	≤3.0
重金属（以Pb计），mg/kg	≤5.0
总砷（以As计），mg/kg	≤2.0
六六六，mg/kg	≤0.1
滴滴涕，mg/kg	≤0.1
菌落总数，CFU/g	≤30000
大肠菌群，MPN/g	≤0.92
霉菌和酵母，CFU/g	≤50
沙门氏菌	≤0/25g

金黄色葡萄球菌	≤0/25g
---------	--------

2. 雨生红球藻提取物

项 目	指 标
来源	雨生红球藻（拉丁名： <i>Haematococcus pluvialis</i> ） 应符合相关食品安全国家标准的规定
制法	经CO ₂ 超临界萃取（50~70MPa，40~80℃，循环气速3.5kg/h）、调配等主要工艺制成
感官要求	红色或深红色油状物
虾青素，%	≥5.0
铅（以Pb计），mg/kg	≤0.1
总砷（以As计），mg/kg	≤4
总汞（以Hg计），mg/kg	≤0.025
镉（以Cd计），mg/kg	≤0.025
菌落总数，CFU/g	≤30000
大肠菌群，MPN/g	≤0.92
霉菌，CFU/g	≤25
酵母，CFU/g	≤25
金黄色葡萄球菌	≤0/25g
沙门氏菌	≤0/25g

3. 红花籽油：应符合GB/T 22465《红花籽油》的规定。
4. 明胶：应符合GB 6783《食品安全国家标准 食品添加剂 明胶》的规定。
5. 纯化水：应符合《中华人民共和国药典》的规定。
6. 甘油：应符合《中华人民共和国药典》的规定。
7. 蜂蜡：应符合GB 1886.87《食品安全国家标准 食品添加剂 蜂蜡》的规定。
8. 二氧化钛：应符合GB 25577《食品安全国家标准 食品添加剂 二氧化钛》的规定。
9. 胭脂红：应符合GB 1886.220《食品安全国家标准 食品添加剂胭脂红》的规定。
