

国家市场监督管理总局

保健食品产品技术要求

BJG20130388

纽崔莱®玑源饮品

NiuGuiLaiRunYanYinPin

【配方】 水解胶原蛋白、维生素C（维生素C、玉米淀粉）、针叶樱桃提取物（针叶樱桃提取物、麦芽糊精）、透明质酸钠、维生素E（DL- α -生育酚醋酸酯、改性淀粉、麦芽糊精、二氧化硅）、赤藓糖醇、天然橙味香精（蔗糖、麦芽糊精、甜橙油、磷脂、二氧化硅、 α -生育酚）、柠檬酸、黄原胶、甜菊糖苷

【生产工艺】 本品经混合、分装等主要工艺加工制成。

【感官要求】 应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	指 标
色泽	黄色乳白色相间
滋味、气味	酸甜味，柑橘类水果香味
性状	粉末
杂质	无肉眼可见杂质

【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
水分，g/100g	≤ 5.0	GB 5009.3-2010
灰分，g/100g	≤ 1.0	GB 5009.4-2010
铅（以Pb计），mg/kg	≤ 0.5	GB 5009.12-2010
砷（以As计），mg/kg	≤ 0.3	GB/T 5009.11-2003

【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 4789.2-2010
大肠菌群, MPN/100g	≤90	GB/T 4789.3-2003
霉菌, cfu/g	≤25	GB 4789.15-2010
酵母, cfu/g	≤25	GB 4789.15-2010
致病菌（指沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌）	不得检出	GB 4789.4-2010、GB/T 4789.5-2003、GB 4789.10-2010、GB/T 4789.11-2003

【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
蛋白质, g/100g	≥23.75	GB 5009.5-2010
羟脯氨酸, g/100g	≥1.9	1 羟脯氨酸的测定
维生素C, mg/100g	400~900	GB 5413.18-2010
维生素E, mg/100g	49.6~112	GB 5413.9-2010
透明质酸, mg/100g	≥220	2 透明质酸的测定

1 羟脯氨酸的测定

1.1 原理：样品在硫酸溶液中水解释放出羟脯氨酸，经氯胺-T氧化生成含有吡咯环的氧化物，用高氯酸破坏过量的氯胺-T，羟脯氨酸氧化物与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物，在560nm波长处进行比色测定。

1.2 仪器

1.2.1 紫外分光光度计

1.2.2 Mettler AT 261分析天平

1.2.3 pH计

1.2.4 水浴锅

1.2.5 电热恒温鼓风干燥箱

1.2.6 振荡器

1.2.7 实验室其它标准的玻璃器具和分析测量仪器

1.3 试剂

1.3.1 标准对照品：反式-4-羟脯氨酸（Sigma公司或等同产品）

1.3.2 高氯酸

1.3.3 浓硫酸

1.3.4 柠檬酸

1.3.5 氯胺-T

1.3.6 三水合乙酸钠

1.3.7 氢氧化钠

1.3.8 异丙醇

1.3.9 正丙醇

1.3.10 4-二甲氨基苯甲醛

1.3.11 缓冲液（pH6.8）：称取26g一水合柠檬酸、14g氢氧化钠和78g三水合乙酸钠，用500mL水溶解，用酸或碱调节pH值至6.8，再加入250mL正丙醇，并用水定容至1L。

1.3.12 氧化剂：精确称取1.41g氯胺-T溶于100mL缓冲液中。该溶液临用前配制。

1.3.13 显色剂：称取10g4-二甲氨基苯甲醛溶于35mL60%（w/w）高氯酸中，缓慢加入65mL异丙醇。临用前配，当天配制。

1.4 羟脯氨酸标准溶液（600 $\mu\text{g/mL}$ ）的配制：精确称取60mg反式-4-羟脯氨酸，加水溶解，加一滴硫酸溶液（3mol/L），定容至100mL。该溶液在4℃下可稳定保存1个月。

1.5 羟脯氨酸标准使用液的配制：吸取5mL羟脯氨酸标准溶液，用水稀释并定容至500mL。该溶液须现用现配。吸取10、20、30、40mL上述稀释液，分别用水稀释并定容至100mL，这些稀释液中羟脯氨酸的含量分别为0.6、1.2、1.8、2.4 $\mu\text{g/mL}$ ，须现用现配。

1.6 标准曲线的绘制：吸取1.5项羟脯氨酸标准使用液稀释液各4.0mL于4支试管中，用4.0mL水作空白对照，按1.8项样品测定，以吸光度值为纵坐标，羟脯氨酸含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）为横坐标，绘制标准曲线。

1.7 样品处理：取适量样品于具塞锥形瓶中，加入硫酸溶液（3mol/L）30mL，盖塞，置105℃干燥箱内恒温水解16h，趁热将水解产物过滤至200mL容量瓶中，用10mL硫酸溶液（3mol/L）分数次洗涤锥形瓶和滤纸，合并至200mL容量瓶中，用氢氧化钠溶液将水解液pH值调至6~8，冷却后加水至刻度，摇匀，稀释并定容滤液，使其浓度在0.6~2.4 $\mu\text{g/mL}$ ，即为样品测定液。

1.8 样品测定：吸取羟脯氨酸标准使用液稀释液各4.0mL于试管中，用4.0mL水作空白对照，向各试管中加入2.0mL氧化剂溶液，振荡混匀，反应20min后，向各试管中加入2.0mL显色剂，充分混合，盖上箔帽或螺帽，于60 $\pm$ 0.5℃水浴20min，用流动水冲洗试管3min使其冷却，在室温下放置30min，用10mm比色皿检测各反应液于560 $\pm$ 2nm波长处的吸光度值。

1.9 结果计算

$$X = \frac{D \times c}{M \times V}$$

式中：

X—样品中羟脯氨酸含量，g/100g；

c—从标准曲线上查得相应的羟脯氨酸含量， $\mu\text{g/mL}$ ；

m—样品质量， μg ；

D—样品被稀释的体积数；

V—所用滤液体积，mL。

2 透明质酸的测定

2.1 原理：样品中透明质酸的检测采用R&D Systems 的DuoSet透明质酸检测试剂盒，该试剂盒采用ELISA（酶联免疫吸附试验）原理，通过酶标仪于450nm波长处测定吸光度值并计算样品中透明质酸的含量。

2.2 试剂

本方法所用水均为纯水，所用试剂均为分析纯。

2.2.1 DuoSet透明质酸检测试剂盒

2.2.1.1 捕获试剂：加入0.25mL PBS溶解后浓度为120 $\mu\text{g/mL}$ ，分装适量到冻存管于低温冰箱（-20~-70℃）中可保存3个月备用，如果保存在2~8℃冰箱可保存1个月备用，在使用时用PBS稀释成0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的工作浓度。

2.2.1.2 检测试剂：加入0.25mL试剂稀释液溶解后浓度为72 $\mu\text{g/mL}$ ，分装适量到冻存管于低温冰箱（-20~-70℃）中可保存3个月备用，如果保存在2~8℃冰箱可保存4个月备用，使用时用试剂稀释液稀释成0.3 $\mu\text{g/mL}$ 的工作浓度。

2.2.1.3 标准品：加入0.5mL试剂稀释液溶解后浓度为1720ng/mL，分装适量到冻存管于低温冰箱（-70℃）中可保存3个月备用，如果保存在2℃~8℃冰箱可保存1个月备用，使用时用试剂稀释液稀释成90ng/mL的最高标准工作浓度然后作3倍系列稀释。

2.2.1.4 酶标试剂：2~8℃冰箱保存，按标签上说明用试剂稀释液稀释。

2.2.1.5 底物溶液：底物试剂A和底物试剂B于2~8℃冰箱保存，使用时按1:1混合。

2.2.1.6 终止液：2N H_2SO_4 ，于2~8℃冰箱保存。

2.2.2 PBS：取8.0g NaCl、0.2g KCl、1.15g Na_2HPO_4 、0.2g KH_2PO_4 溶于1000mL纯水中，用0.2 μm 滤膜过滤。

2.2.3 吐温20

2.2.4 洗板液：将吐温20溶于PBS中制成浓度为0.05%的溶液，并调节pH值至7.2~7.4。

2.2.5 包被液：将吐温20溶于PBS中制成浓度为5%的溶液。

2.2.6 试剂稀释液：将吐温20溶于PBS中制成浓度为5%的溶液，并调节pH值至7.2~7.4。

2.3 仪器

2.3.1 96孔微孔板

2.3.2 冻存管：2mL、4mL

2.3.3 离心机：转速>2000r/min

2.3.4 定量移液枪：2~20μL、20~200μL

2.3.5 低温冰箱：-70℃

2.3.6 灭菌锅

2.3.7 酶标仪：450nm

2.3.8 过滤装置

2.3.9 容量瓶：50mL、100mL

2.3.10 分析天平：感量0.1mg

2.4 样品制备：准确称取适量样品于100mL容量瓶，用适当的稀释剂定容至刻度，充分混匀，标准曲线的浓度梯度为90、30、10、3.33、1.11、0.37ng/mL。根据样品中透明质酸钠的含量作适当稀释，最后一步的稀释要使用包被液稀释，使样品最终的浓度落在标准曲线的中间范围（10~2.5 ng/mL）。

2.5 样品测定：用PBS将捕获试剂稀释成0.5μg/mL的工作液（不带蛋白），立刻包被酶标板，每孔100μL，密封，室温孵育过夜，洗涤（倒去捕获试剂，用洗板液洗涤三次，每孔约400μL，每次2 min，每次洗涤后都要完全甩干净洗液，有利于得到更好的结果，最后一次洗完，在干净纸巾彻底拍干）。加包被液，每孔300μL，室温孵育至少1h，同上法洗涤。将样品和标准工作溶液分别加入到孔中，每孔100μL，用新的封膜密封，室温孵育2h，同上法洗涤。每孔加100μL检测试剂（0.3μg/mL），封膜密封，室温孵育2h，同上法洗涤。每孔加100μL辣根过氧化物酶标记链霉亲和素（Streptavidin-HRP），封膜密封，室温下避光孵育20min，同上法洗涤。每孔加100μL底物溶液，室温下避光孵育20min，每孔加50μL终止液，轻弹微孔板以混匀，15min内放入酶标仪（450nm）中检测每孔的光密度。

2.6 结果计算

$$X = \frac{C \times F \times 100}{M \times 1000 \times 1000}$$

式中：

X—样品中透明质酸含量，mg/g；

C—从标准曲线上得到的样品中透明质酸的平均含量，ng/mL；

F—稀释因子；

100—样液体积，μL；

M—样品称取量，g；

1000×1000—ng换算为mg。

【保健功能】 改善皮肤水份

【适宜人群】 皮肤干燥者

【不适宜人群】 少年儿童、孕妇、乳母

【食用方法及食用量】 每日1包，每包用150ml水冲调，搅拌均匀后饮用

【规格】 8g/包

【贮藏】 贮存于30℃以下的阴凉干燥处

【保质期】 18个月
