

国家食品药品监督管理总局

保健食品产品技术要求

BJG20100539

洛合宁®红曲蜂胶银杏叶葡萄籽绿茶片

LuoHeNing®HongQuFengJiaoYinXingYePuTaoZiLvChaPian

【生产工艺】 本品经提取（蜂胶冷冻、粉碎，依次用4倍量95%、85%、75%乙醇25℃溶解24h）、浓缩、干燥（≤50℃）、粉碎、混合、制粒、压片、辐照灭菌（⁶⁰Co，6kGy）、包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	红褐色，色泽均匀
滋味、气味	松脂香味，无其它异味
性状	片剂，完整光洁，有适宜的硬度
杂质	无正常视力可见外来杂质

【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
钙（以Ca计），g/100g	4.8~8.1	GB 5009.92 “第二法 EDTA滴定法”
水分，g/100g	≤9.0	GB 5009.3
灰分，g/100g	≤18.0	GB 5009.4
崩解时限，min	≤30.0	《中华人民共和国药典》
铅（以Pb计），mg/kg	≤2.0	GB 5009.12
总砷(以As计)，mg/kg	≤1.0	GB 5009.11
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

黄曲霉毒素B ₁ , µg/kg	≤5.0	GB 5009.22
桔青霉素, µg/kg	不得检出	1 桔青霉素的测定

1 桔青霉素的测定（来源于《保健食品检验与评价技术规范》（2003年版））

1.1 范围：本方法适用于红曲米、红曲红、红曲发酵液和功能性红曲中桔青霉素的测定。

1.2 原理：试样中的桔青霉素经提取、净化及浓缩后，根据在高压液相色谱上的峰面积测定含量。

1.3 试剂

1.3.1 乙腈：HPLC级。

1.3.2 磷酸：分析纯或色谱纯。

1.3.3 甲醇：HPLC级。

1.3.4 甲苯：分析纯。

1.3.5 乙酸乙酯：分析纯。

1.3.6 甲酸：分析纯。

1.3.7 水：去离子水。

1.3.8 乙醇：色谱纯。

1.3.9 桔青霉素标准溶液：准确称取桔青霉素标准品（美国Sigma公司），用甲醇溶解，制成500mg/L的储藏液，工作液稀释到100mg/L，置4℃冰箱中备用。

1.3.10 高压液相色谱洗脱剂：乙腈-去离子水（用色谱纯磷酸调pH至2.5）[35+65, v/v]

1.4 仪器

1.4.1 高效液相色谱仪。

1.4.2 色谱柱：Eclipse XDB C₁₈反相色谱柱，250×4.6mm，粒度直径为5µm。

1.4.3 试样环：20µL。

1.4.4 检测器：荧光检测器， λ_{ex} =331， λ_{em} =500。

1.4.5 VCX 400超声波细胞破碎仪。

1.4.6 电子天平：千分之一或万分之一。

1.4.7 pH计：精度为0.01。

1.4.8 匀浆器。

1.4.9 离心机。

1.4.10 旋转蒸发器。

1.4.11 分光光度计。

1.4.12 0.45μm的微孔偏氟滤膜。

1.4.13 具塞试管。

1.4.14 烧杯。

1.4.15 比色管。

1.5 分析步骤

1.5.1 桔青霉素的提取

1.5.1.1 红曲米样品的预处理：准确称取粉碎的红曲米粉（细度达到测定色价时的要求）0.5～3.0g（根据红曲样品中的桔青霉素含量高低而定）于50mL烧杯中，加入20mL复合萃取剂甲苯：乙酸乙酯：甲酸（7:3:1，v/v），称重，记录下连烧杯在内的重量，超声波处理10min（强度40%，5s，5s），自然澄清后称重，如果重量低于原重量，需用复合萃取剂补足。将上清液移入50mL具塞试管中，残渣中另加入15mL复合萃取剂，第二次称重并超声波处理（10min），自然澄清后称重，用复合萃取剂补足至超声处理前的重量，上清液移入50mL具塞试管，残渣用15mL复合萃取剂再重复提取一次。合并三次提取液，充分混匀后取30mL离心（3000rpm，20min），上清液真空浓缩至干后溶于30mL甲醇中，微滤后取20μL进行HPLC分析。

1.5.1.2 液态发酵液的预处理：用均质器将发酵液中的菌丝打碎，取10mL均匀打碎的发酵液于比色管中，用乙醇定容至25mL，60℃加热1h（期间不断振摇），3000rpm离心15min，上清液微滤后取20μL进行HPLC分析。

1.5.2 高压液相色谱测定

高压液相色谱分析条件：流速1.0mL/min，柱温28℃。分析时，首先用洗脱液平衡分析柱，基线稳定后将不同浓度的桔青霉素标准液（0.05、0.10、0.25、1.0、5.0、10.0mg/L）进行HPLC分析，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，以桔青霉素含量为横坐标做图，结果显示在0.1～10mg/L范围内线性关系良好， $R^2=0.9995$ 。在桔青霉素标准峰面积的直线范围内分别注入不同发酵产品提取液20μL，将样液与标准的峰面积相比以求出试样中桔青霉素的含量，桔青霉素的保留时间为18.2min左右。

1.5.3 结果计算：样品中桔青霉素含量采用与标准桔青霉素样品峰面积相比较的原理进行计算。

1.5.3.1 固态样品中桔青霉素含量计算

公式1（根据标准样的浓度和峰面积以及上样的峰面积、稀释倍数计算）

$$X = D_S \times (Y_2 \times X_1) / Y_1$$

公式2（根据一系列标准样浓度与其峰面积所得出的计算公式计算）

$$X = D_S \times (Y_2 + 0.2669) / 89.72$$

式中：

X—样品中桔青霉素浓度，mg/kg；

D_S —稀释倍数，V/W；

X_1 —标样浓度，mg/L；

Y_1 —标样峰面积；

Y_2 —样品峰面积；

W —样品重量，g；

V —固态萃取时的萃取剂总体积，mL；

1.5.3.2 液态红曲样品桔青霉素浓度计算

公式1（根据标准样的浓度和峰面积以及上样的峰面积，稀释倍数计算）

$$X = D_L \times (Y_2 \times X_1) / Y_1$$

公式2（根据一系列标准样浓度与其峰面积所得出的计算公式计算）

$$X = D_S \times (Y_2 + 0.2669) / 89.72$$

式中：

D_L —稀释倍数（ V_E/V_L ）；

V_E —液态萃取时总体积（mL）；

V_L —发酵液体积（mL）；

其余参数同固体样品计算方法。

1.5.4 确证：为进一步确认从HPLC图谱上观察到的与标准桔青霉素出峰时间相当的物质是否为桔青霉素，阳性试样还需用薄层色谱法中样液与标准液点重叠的方法确证，或用HPLC配二级管阵列检测器和液相色谱-质谱联机进行确认，若样品中疑为桔青霉素物质的光谱、质谱图与桔青霉素标准的光谱、质谱图完全吻合，则证明所测样品中与桔青霉素标准品保留时间相当位置处的峰即是桔青霉素。

1.6 检测限：本方法的最低检测浓度为50μg/kg（μg/L）。

【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
金黄色葡萄球菌	≤0/25g	GB 4789.10
沙门氏菌	≤0/25g	GB 4789.4

【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
茶多酚, g/100g	≥ 6.1	1 茶多酚的测定
总黄酮(以芦丁计), g/100g	≥ 2.75	2 总黄酮的测定
原花青素, g/100g	≥ 4.79	3 原花青素的测定
洛伐他丁, g/100g	0.41~0.59	4 洛伐他丁的测定

1 茶多酚的测定

1.1 原理: 本品所含的茶多酚类物质能与亚铁离子形成紫蓝色络合物。可用紫外法测定其含量。

1.2 仪器

1.2.1 721分光光度计。 1.2.2 分析天平, 感量0.001g。 1.3 试剂

所用试剂为分析纯; 实验用水为蒸馏水。

1.3.1 酒石酸亚铁溶液: 称取1.0g硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 5g酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 用水溶解并定容为1L(低温可保存10天)。

1.3.2 pH7.5磷酸盐缓冲液 1.3.2.1 1/15mol/L磷酸氢二钠: 称取23.87g十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 加水溶解后定容为1L。

1.3.2.2 1/15mol/L磷酸二氢钾: 称取110℃烘干2h的磷酸二氢钾9.08g, 加水溶解后定容为1L。

1.3.2.3 取1/15mol/L的磷酸氢二钠溶液85mL, 1/15mol/L磷酸二氢钾溶液15mL混合。即为pH 7.5的磷酸盐缓冲液。 1.4 样品处理: 称取本品约0.5g, 精密定容于200mL容量瓶中, 加沸水约70mL, 沸水浴约30min, 取出放冷, 用蒸馏水定容, 混匀, 过滤。即为样品处理液。

1.5 测定: 取样品处理液1.0mL于25mL比色管中, 加入4mL水, 5mL酒石酸亚铁溶液, 充分混匀, 再加pH 7.5盐酸盐缓冲液至刻度, 用10mm比色皿, 在波长540nm处, 以试剂空白作参比, 测定吸光度值。 1.6 计算

$$X = (A \times 2 \times 1.957 \times V) / M$$

式中:

X—样品中茶多酚含量, mg/g;

A—吸光度值;

V—样品处理液总体积, mL;

M—取样量, g;

1.957—用10mm比色皿, 当吸光度为0.5时, 每mL样品液相当于含茶多酚1.957mg。

2 总黄酮的测定(来源于《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版))

2.1 试剂

2.1.1 聚酰胺粉

2.1.2 芦丁标准溶液: 称取5.0mg芦丁, 加甲醇溶解并定容至100mL, 即得50μg/mL。

2.1.3 乙醇: 分析纯。

2.1.4 甲醇: 分析纯。

2.2 分析步骤

2.2.1 试样处理: 称取一定量的试样, 加乙醇定容至25mL, 摇匀后, 超声提取20min, 放置, 吸取上清液1.0mL, 于蒸发皿中, 加1g聚酰胺粉吸附, 于水浴上挥去乙醇, 然后转入层析柱。先用20mL苯洗, 苯液弃去, 然后用甲醇洗脱黄酮, 定容至25mL。此液于波长360nm测定吸收值。同时以芦丁为标准品, 测定标准曲线, 求回归方程, 计算试样中总黄酮含量。

2.2.2 芦丁标准曲线: 吸取芦丁标准溶液: 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL于10mL比色管中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 于波长360nm比色。求回归方程, 计算试样中总黄酮含量。

2.3 计算和结果表示:

$$X = (A \times V_2 \times 100) / (V_1 \times M \times 1000)$$

式中:

X—试样中总黄酮的含量, mg/100g。

A—由标准曲线算得被测液中黄酮量, μg ;

M—试样质量, g;

V_1 —测定用试样体积, mL;

V_0 —试样定容总体积, mL。

计算结果保留二位有效数字。

3 原花青素的测定（来源于《保健食品检验与评价技术规范》（2003年版））

3.1 范围

本方法规定了保健食品中原花青素的测定方法。

本方法适用于保健食品中原花青素的含量测定。

本方法最低检出量为 $3\mu\text{g}$, 最低检出浓度为 $3\mu\text{g/mL}$ 。

本方法最佳线性范围: $3\sim 150\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 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。

3.3 试剂

3.3.1 甲醇: 分析纯。

3.3.2 正丁醇: 分析纯。

3.3.3 盐酸: 分析纯。

3.3.4 硫酸铁铵: $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液: 用浓度为 2mol/L 盐酸配成 2% (w/v) 的溶液。

3.3.5 原花青素标准品: 葡萄籽提取物, 纯度 95% 。

3.4 仪器

3.4.1 分光光度计。

3.4.2 回流装置。

3.5 分析步骤

3.5.1 试样的制备

3.5.1.1 片剂: 取20片试样, 研磨成粉状。

3.5.1.2 胶囊: 挤出20粒胶囊内容物, 研磨或搅拌均匀, 如内容物含油, 应将内容物尽可能挤出。

3.5.1.3 口服液: 摇匀后取样。

3.5.2 提取

3.5.2.1 粉状试样: 称取 $50\sim 100\text{mg}$ 试样, 置于 50mL 容量瓶中, 加入 30mL 甲醇, 超声处理 20min , 放冷至室温后, 加甲醇至刻度, 摇匀, 离心或放置至澄清后取上清液备用。

3.5.2.2 含油试样: 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。

3.5.2.3 口服液: 吸取适量样液 (取样量不超过 1mL), 置于 50mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。

3.5.3 测定

3.5.3.1 标准曲线: 称取原花青素标准品 10.0mg 溶于 10mL 甲醇中, 吸取该溶液 0 、 0.1 、 0.25 、 0.5 、 1.0 、 1.5mL , 置于 10mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。各取 1mL 测定。与试样测定方法相同。

3.5.3.2 试样测定: 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 试样溶液, 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。显色在 1 小时内稳定。

3.6 分析结果表述: 试样中原花青素测定结果按 (1) 式计算。

3.6.1 计算:

$$X(\%) = (m_1 \times v \times 1000 \times 100) / (m \times 1000 \times 1000) \dots\dots\dots (1)$$

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。

3.6.2 结果表示：计算结果保留三位有效数字。

3.7 技术参数

3.7.1 相对标准偏差：<10%。

3.7.2 回收率：84.6~94.4%。

4 洛伐他丁的测定（来源于《保健食品检验与评价技术规范》（2003年版））

4.1 范围

本方法规定了保健食品中洛伐他丁含量的测定方法。

本方法适用于洛伐他丁作为功效成分添加于片剂、胶囊以及红曲发酵原料等试样类型中含量的测定。

本方法的最低检出量2.0mg/kg。

本方法的最佳线性范围2.00~300μg/mL。

4.2 原理：将酸性介质中的试样使用三氯甲烷进行提取，挥干提取溶剂，以流动相定容，根据高效液相色谱紫外检测器在238nm处的响应进行定性定量。

4.3 试剂

4.3.1 甲醇：色谱纯。

4.3.2 三氯甲烷：分析纯。

4.3.3 磷酸：分析纯。

4.3.4 洛伐他丁标准储备液：准确称量洛伐他丁标准品0.0400g，加入检测用流动相并定容至100mL。此溶液每1mL含0.4mg洛伐他丁。

4.3.5 洛伐他丁标准使用液：将洛伐他丁标准储备溶液用流动相稀释10倍。此溶液每1mL含40μg洛伐他丁。

4.4 仪器设备

4.4.1 高效液相色谱仪：附紫外检测器（UV）。

4.4.2 超声波清洗器。

4.4.3 涡旋混匀器。

4.4.4 离心机。

4.4.5 真空泵。

4.5 分析步骤

4.5.1 试样处理：将片剂、胶囊或红曲发酵产物试样粉碎并混合均匀，根据试样中洛伐他丁含量准确称取一定量试样于50mL试管中，加入10.0mL pH=3磷酸水溶液。超声提取10min后再加入10.0mL三氯甲烷，置于涡旋混匀器3min。静置后去掉上层水相，将三氯甲烷层以3000rpm/min离心3min。准确吸取上清液1.0mL至5mL试管中，将试管置于50℃左右水浴中使用真空泵减压干燥至挥去全部溶剂。向试管中加入流动相并定容至5.0mL，彻底混匀，经0.45μm滤膜过滤后待进样。

4.5.2 液相色谱参考条件

4.5.2.1 色谱柱：C₁₈柱，4.6×250mm。

4.5.2.2 柱温：室温。

4.5.2.3 紫外检测器：检测波长238nm。

4.5.2.4 流动相：甲醇:水:磷酸=385:115:0.14。

4.5.2.5 流速：1.0mL/min。

4.5.2.6 进样量：10μL。

4.5.2.7 色谱分析：量取10μL标准溶液系列及试样溶液注入色谱仪中，以保留时间定性，以试样峰高或峰面积与标准比较定量。

4.5.2.8 色谱图



色谱图中洛伐他丁浓度为25μg/mL

4.5.3 标准曲线制备：配制浓度为2.0、10、50、100、300μg/mL洛伐他丁标准溶液，在给定的仪器条件下进行液相色谱分析，以峰高或峰面积对浓度作标准曲线。

4.5.4 分析结果表示

4.5.4.1 计算

$$X = (h_1 \times c \times 50 \times 100) / (h_2 \times m \times 1000)$$

式中：

X—试样中洛伐他丁的含量，g/100g；

h_1 —试样峰高或峰面积；

c —标准溶液浓度，mg/mL；

50—试样稀释倍数；

h_2 —标准溶液峰高或峰面积；

m —试样量，g。

4.5.4.2 结果表示：检测结果保留三位有效数字。

4.6 技术参数

4.6.1 准确度：方法的回收率在93.3%~108.4%之间。

4.6.2 允许差：平行样测定相对误差≤±5%。

【保健功能】 辅助降血脂

【适宜人群】 血脂偏高者

【不适宜人群】 少年儿童、孕妇、乳母、对蜂胶过敏者

【食用方法及食用量】 每日3次，每次2片，温开水送食

【规格】 0.65g/片

【贮藏】 密封，置阴凉干燥处

【保质期】 24个月
