

附2

国家市场监督管理总局 保健食品产品技术要求

国食健注G20100702

保罗牌胶原蛋白鼠李糖乳杆菌粉

【原料】 胶原蛋白、维生素C（L-抗坏血酸）、鼠李糖乳杆菌粉、核苷酸

【辅料】 木糖醇、磷酸三钙、甜橙粉末香精

【生产工艺】 本品经过筛、混合、分装等主要工艺加工制成。

【直接接触产品包装材料种类、名称及标准】

药品包装用复合膜应符合YBB00172002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	黄色
滋味、气味	具本品固有的滋味、气味，无异味
性状	粉末
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
水分, %	≤7.0	GB 5009.3
灰分, %	≤8.0	GB 5009.4
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

【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
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
鼠李糖乳杆菌, CFU/100g	≥1.0×10 ⁹	1 鼠李糖乳杆菌活菌计数
核苷酸(以5'-AMP计), mg/100g	≥45.0	2 核苷酸的测定
维生素C, g/100g	1.46~2.73	GB 5009.86
蛋白质, g/100g	≥60.0	GB 5009.5

1 鼠李糖乳杆菌活菌计数

1.1 原理: 样品经稀释剂稀释后均质, 然后按10倍的稀释倍数接种到选择性琼脂培养基中, 厌氧培养, 计数所有的菌落, 结果以CFU/g计。(附注: 培养过程中, 所有万古霉素抗性的菌株都会生长(比如所有的鼠李糖乳杆菌, 干酪乳杆菌, 胚芽乳杆菌等)。但是, 由于LGG不发酵乳糖, 所以可以很容易地区分开来。进一步分析鉴定则可采用基因的方法。

1.2 仪器和玻璃器皿

只要规格可以满足要求, 采用一次性或可重复使用的仪器均可。除了微生物实验室所常用的仪器外, 下列仪器是必需的:

1.2.1 烘箱

1.2.2 高压杀菌锅

1.2.3 培养箱(37℃±1℃)

1.2.4 水浴(44~47℃)

1.2.5 混合器(Peristaltic-type), 带有无菌塑料袋

1.2.6 天平

1.3 培养基和试剂

1.3.1 稀释液准备: 蛋白胨1.0g、氯化钠8.5g、去离子水1000mL。若需要, 可缓慢加热至完全溶解。将溶液分至一些瓶子中, 然后在高压杀菌锅中进行杀菌(121±1℃, 15min)。杀菌后, 溶液pH值为7.0±0.2。每个瓶子均可在常温下贮存半年。

1.3.2 培养基

1.3.2.1 MRS琼脂培养基: 高压杀菌后pH6.4±0.2, 4~6℃条件下可贮存6个月。

1.3.2.2 MRS-万古霉素琼脂培养基(MRS-V): 适用于混合菌种。万古霉素50mg/L, 可以在高压杀菌前加入, 也可以作为无菌滤液加入琼脂中。

1.3.2.3 MRSL肉汤培养基(检测乳糖发酵特性)

蛋白栋	10.0g
酵母提取物	5.0g
乳糖	20.0g

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2.0g
三水乙酸钠	5.0g
柠檬酸三铵	2.0g
MgSO ₄ ·H ₂ O *	0.2g
MnSO ₄ ·H ₂ O *	0.05g
吐温80	1mL
溴甲酚紫 #	0.05g
水	1000mL

注：*—分别溶解；#—溶解于5~10mL乙醇中，然后加入肉汤中。

取5mL试样，高压杀菌（121℃±1℃，15min）后作测试用。杀菌后，溶液pH7.2±0.2。

1.4 样品制备：样品制备前，先放置于室温下1~2h，以使其温度与室温相同。称取10g样品于无菌塑料袋中，加入90mL无菌蛋白胨-氯化钠水溶液。将塑料袋放入混合器中混合60sec，以确保悬浮液均匀一致。这是第一个稀释10倍的样液，该溶液必须继续按10倍的倍数进行稀释，且必须在15min内将各样液接种到培养皿中。

1.5 在选择性琼脂培养基中接种：选择合适的琼脂培养基：纯菌种用MRS琼脂培养基，混合菌种用MRS-万古霉素琼脂培养基。取1mL（倾倒入法）或0.1mL（涂抹法）每一稀释度的样液分别接种到两个培养皿中，琼脂的温度应为44~47℃，然后于厌氧条件下进行培养72±6h（37±1℃）。

1.6 菌落计数：计数那些LGG菌落在10~300之间的培养皿。LGG菌落特征：光滑、大、白色、圆形或椭圆形、边缘清晰。

1.7 确认实验：为了进一步确认菌落是否为LGG，可从菌落中挑取一些纯菌种，进行显微镜观察和乳糖发酵实验（MRSL肉汤）。做乳糖发酵实验时，将挑取的纯菌种接种到肉汤培养基后，有氧培养1~2天（37±1℃）。由于LGG不发酵乳糖，故肉汤应是紫色的（未变色）。而若是能够利用乳糖的微生物，则肉汤变为黄色。实验时，利用纯LGG菌种和任一能够利用乳糖的其它菌种进行对照实验。

1.8 结果计算：以每克样品中LGG的菌落数表示，即CFU/g。

2 核苷酸的测定（来源于《保健食品检验与评价技术规范》（2003年版））

2.1 范围

本方法规定了保健食品中核苷酸的高效液相色谱测定方法。

本方法适用于作为功效成分添加于婴幼儿配方奶粉中核苷酸的含量测定。

本方法检出限：胞嘧啶核苷（CMP）0.04μg/mL、尿嘧啶核苷（UMP）0.05μg/mL、腺嘌呤核苷（AMP）0.05μg/mL、鸟嘌呤核苷（GMP）0.06μg/mL、次黄嘌呤核苷（IMP）0.04μg/mL。

本方法线性范围：胞嘧啶核苷（CMP）0.992~12.4μg/mL、尿嘧啶核苷（UMP）1.17~14.6μg/mL、腺嘌呤核苷（AMP）1.01~12.6μg/mL、鸟嘌呤核苷（GMP）0.948~12.3μg/mL、次黄嘌呤核苷（IMP）1.30~16.3μg/mL。

2.2 原理：将试样溶解、去除蛋白后，使用氨基固相萃取柱对核苷酸进行净化富集，根据高效液相色谱紫外检测器在254nm处的响应进行定性定量。

2.3 试剂

除非另有说明，在分析中仅使用确定为分析纯的试剂和双蒸水。

2.3.1 甲醇：优级纯。

2.3.2 乙酸。

2.3.3 磷酸二氢钾。

2.3.4 磷酸氢二钾。

2.3.5 季铵盐固相萃取柱。

2.3.6 核苷酸标准储备溶液：准确称量经100℃，4h干燥处理的标准品胞嘧啶核苷（CMP）100mg，尿嘧啶核苷（UMP）、腺嘌呤核苷（AMP）、鸟嘌呤核苷（GMP）、次黄嘌呤核苷（IMP）各40mg，加水定容至100mL。

L。

2.3.7 核苷酸标准使用液：将核苷酸标准储备溶液用0.25mol/L, pH=3的磷酸二氢钾稀释100倍。

2.4 仪器

2.4.1 高效液相色谱仪：附紫外检测器（UV）。

2.5 分析步骤

2.5.1 试样处理

2.5.1.1 准确称取10g试样于100mL容量瓶中，加入约50℃热水80mL，彻底混匀。当试样液达到室温后用水定容至刻度。

2.5.1.2 准确吸取10mL试样溶液至100mL容量瓶中，加入0.5%乙酸5mL、水10mL，混匀后静置5min以沉淀蛋白。用水定容至刻度，混匀后过滤，弃去数mL初滤液后收集约30mL滤液。

2.5.1.3 将季铵盐固相萃取柱先用10mL甲醇、10mL水活化后，再将20mL试样滤液过滤，以1mL水清洗萃取柱，用0.25mol/L, pH=3.5磷酸二氢钾溶液洗脱出5mL滤液。全部过程需要控制流速1滴/秒。

2.5.2 液相色谱参考条件

2.5.2.1 色谱柱：C₁₈柱，3.9×150mm。

2.5.2.2 柱温：25℃。

2.5.2.3 紫外检测器：检测波长254nm。

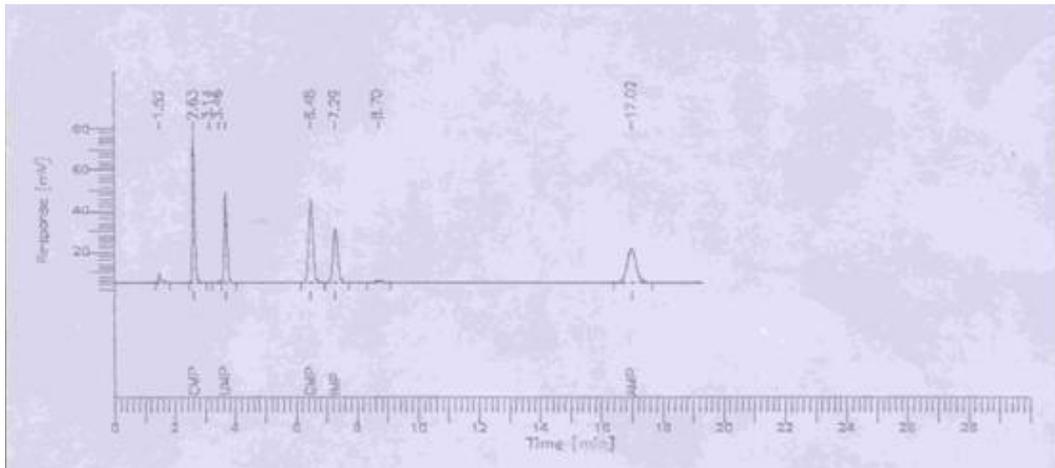
2.5.2.4 流动相：0.01mol/L磷酸二氢钾：0.1mol/L磷酸氢二钾=480:20。

2.5.2.5 流速：0.6mL/min。

2.5.2.6 进样量：10μL。

2.5.2.7 色谱分析：量取10μL标准溶液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。

2.5.2.8 保留时间



在上述色谱条件下，5种核苷酸的保留时间见色谱图，浓度分别为胞嘧啶核苷（CMP）12.4μg/mL，尿嘧啶核苷（UMP）14.6μg/mL、腺嘌呤核苷（AMP）16.3μg/mL、鸟嘌呤核苷（GMP）12.6μg/mL、次黄嘌呤核苷（IMP）12.3μg/mL。

2.5.3 分别配制浓度为1.0、2.0、5.0、10.0、16.0μg/mL的4种核苷酸标准溶液，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。

2.6 分析结果表述

2.6.1 计算

$$X = \frac{h_1 \times C \times K \times 5 \times 100}{h_2 \times m \times 1000}$$

式中：

X—试样中核苷酸的含量，mg/100g；

h₁—试样峰高或峰面积；

C—标准溶液浓度，μg/mL；

K—稀释倍数；

h₂—标准溶液峰高或峰面积；

m—试样量，g。

2.6.2 结果表示：检测结果保留三位有效数字。

2.7 技术参数

回收率：回收率在85.0~96.7%之间。

使用相同方法对同一试样平行测定的绝对差值在平均值的10%范围内。

【装量或重量差异指标/净含量及允许负偏差指标】 净含量为3g/袋，允许负偏差为9%。

【原辅料质量要求】

1. 胶原蛋白：应符合QB 2732《水解胶原蛋白》的规定。
2. 维生素C（L-抗坏血酸）：应符合《中华人民共和国药典》的规定。
3. 鼠李糖乳杆菌粉

项 目	指 标
拉丁名称	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
来源	脱水的发酵牛乳
制法	鼠李糖乳杆菌经发酵培养（35℃、12h）、离心、冻干（冷冻至-35℃保持1~2h，干燥温度25~30℃）等主要工艺加工制成
感官要求	白色粉末
鼠李糖乳杆菌活菌数，CFU/g	$\geq 1.0 \times 10^{11}$
水分，%	≤ 5.0
铅（以Pb计），mg/kg	≤ 2.0
总砷（以As计），mg/kg	≤ 1.0
总汞（以Hg计），mg/kg	≤ 0.3
大肠菌群，MPN/g	≤ 0.92
霉菌和酵母，CFU/g	≤ 50
金黄色葡萄球菌	$\leq 0/25g$
沙门氏菌	$\leq 0/25g$

4. 核苷酸：应符合QB/T 4358《营养强化剂 5'-腺苷酸》的规定。
 5. 木糖醇：应符合GB 1886.234《食品安全国家标准 食品添加剂 木糖醇》的规定。
 6. 磷酸三钙：应符合GB 25558《食品安全国家标准 食品添加剂 磷酸三钙》的规定。
 7. 甜橙粉末香精：应符合GB 30616《食品安全国家标准 食品用香精》的规定。
-