

国家市场监督管理总局
保健食品产品技术要求

国食健注G20190423

方格牌红曲丹参灵芝胶囊

- 【原料】 红曲、丹参提取物、黑木耳提取物、灵芝提取物
- 【辅料】 糊精、硬脂酸镁
- 【生产工艺】 本品经过筛、混合、装囊、包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】 口服固体药用聚酯瓶应符合YBB00262002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	内容物呈棕色至褐色
滋味、气味	具本品特有的滋味、气味，无异味
性状	硬胶囊，完整光洁，无粘结、无变形、无破裂、无渗漏；内容物为粉末
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
水分，%	≤9.0	GB 5009.3
灰分，%	≤9.0	GB 5009.4
崩解时限，min	≤60	《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
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
桔青霉素, μg/kg	≤50	1 桔青霉素的测定
黄曲霉毒素B ₁ , μg/kg	≤10	GB 5009.22

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
沙门氏菌	$\leq 0/25g$	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌	$\leq 0/25g$	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
洛伐他汀, mg/100g	195~416.6	1 洛伐他汀的测定
粗多糖（以葡萄糖计）, g/100g	≥ 4.0	2 粗多糖的测定
丹参酮IIA, mg/100g	≥ 310	《中华人民共和国药典》中“丹参”项下“含量测定”规定的方法

1 洛伐他汀的测定（来源于《保健食品检验与评价技术规范》（2003年版））

1.1 范围

本方法规定了保健食品中洛伐他汀含量的测定方法。

本方法适用于洛伐他汀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2.00~300 μ g/mL。

1.2 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。

1.3 试剂

1.3.1 甲醇：色谱纯。

1.3.2 三氯甲烷：分析纯。

1.3.3 磷酸：分析纯。

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

1.3.5 洛伐他汀标准使用液：将洛伐他汀标准储备溶液用流动相稀释10倍。此溶液每1mL含40 μ g洛伐他汀。

1.4 仪器设备

1.4.1 高效液相色谱仪：附紫外检测器（UV）。

1.4.2 超声波清洗器。

1.4.3 涡旋混匀器。

1.4.4 离心机。

1.4.5 真空泵。

1.5 分析步骤

1.5.1 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，根据试样中洛伐他汀含量准确称

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。

1.5.2 液相色谱参考条件

1.5.2.1 色谱柱：C₁₈柱，4.6×250mm。

1.5.2.2 柱温：室温。

1.5.2.3 紫外检测器：检测波长238nm。

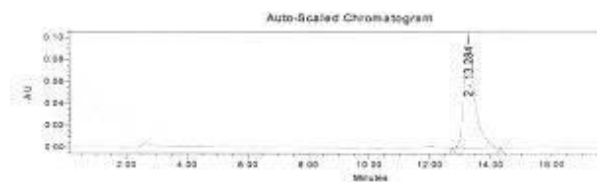
1.5.2.4 流动相：甲醇:水:磷酸=385:115:0.14。

1.5.2.5 流速：1.0mL/min。

1.5.2.6 进样量：10μL。

1.5.2.7 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。

1.5.2.8 色谱图



色谱图中洛伐他汀浓度为25μg/mL

1.5.3 标准曲线制备：配制浓度为2.0、10、50、100、300μg/mL洛伐他汀标准溶液，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。

1.5.4 分析结果表示

1.5.4.1 计算

$$X = \frac{h_1 \times c \times 50 \times 100}{h_2 \times m \times 1000}$$

式中：

X—试样中洛伐他汀的含量，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。

1.5.4.2 结果表示：检测结果保留三位有效数字。

1.6 技术参数

1.6.1 准确度：方法的回收率在93.3%~108.4%之间。

1.6.2 允许差：平行样测定相对误差≤±5%。

2 粗多糖的测定

2.1 原理：多糖经乙醇沉淀分离后，去除其他可溶性糖及杂质的干扰，糖与硫酸在沸水浴中加热脱水生成羟甲基呋喃甲醛（羟甲基糖醛），再与蒽酮缩合成蓝绿色化合物，其呈色强度与溶液中糖的浓度呈正比，在625nm波长下比色定量。

2.2 仪器

- 2.2.1 离心机：4000r/min。
- 2.2.2 50mL离心管或15mL具塞离心管。
- 2.2.3 分光光度计。
- 2.2.4 水浴锅。
- 2.2.5 漩涡混合器。

2.3 试剂

实验用水为双蒸水；所用试剂为分析纯级。

- 2.3.1 无水乙醇。
- 2.3.2 80%乙醇溶液（V/V）。
- 2.3.3 80%硫酸（W/V）。
- 2.3.4 葡萄糖标准液：准确称取干燥恒重的分析纯葡萄糖0.5000g，加水溶解，并定容至50mL，此溶液每1mL含葡萄糖10mg，用前稀释100倍为使用液（0.1mg/mL）。
- 2.3.5 0.1%蒽酮硫酸溶液（W/V）：准确称取0.1g蒽酮置于烧杯中，缓慢加入100mL80%硫酸溶解，溶解后呈黄色透明溶液，现用现配。

2.4 样品处理

2.4.1 样品提取：准确称取均匀研碎的样品粉末1.0~2.0g，置于100mL的容量瓶中，加水80mL左右，于沸水浴中加热15min，冷却至室温后补加水至刻度（ V_1 ），混匀后过滤，弃去初滤液，收集续滤液。取50mL样品提取液置于100mL具塞锥形瓶中，冷却至60℃以下，加适量的葡萄糖苷酶（约为样液体积的1%）于60℃以下在水解60min后取出（用碘液检验是否水解完全，如不完全可延长水解时间至酶解液不变蓝色为止），与电炉上小心加热至沸（灭酶），冷却，定容，过滤，取滤液沉淀多糖。

2.4.2 沉淀粗多糖：准确吸取上述滤液5.0mL（ V_2 ），置于50mL离心管中（或2.0mL于15mL具塞离心管中），加入无水乙醇20mL（或8mL），混匀，于4℃冰箱静置4h以上，以4000r/min离心5min，弃去上清液，残渣用80%（V/V）乙醇溶液数毫升洗涤，离心后弃上清液，反复操作3次，残渣用水溶解并定容至10~25mL（ V_3 ）（根据糖浓度而定）。

2.5 标准曲线的绘制：准确吸取葡萄糖标准使用液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL（相当于葡萄糖0、0.020、0.040、0.060、0.080、0.10、0.12mg），于10mL具塞比色管中，加水至2.0mL，加入0.1%蒽酮硫酸溶液6mL，在漩涡混合器上混匀，在沸水浴中加热10min，取出在流水中冷却20min后，在625nm波长处以试剂空白为参比，1cm比色皿测定吸光度值。以葡萄糖质量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

2.6 样品测定：准确吸取样品待测液2.0mL（含糖20~100μg）按标准曲线绘制步骤于625nm波长下测定吸光度值并求出样品含糖量。

2.7 结果计算

$$X = \frac{m_1 \times V_1 \times V_3}{m_2 \times V_2 \times V_4} \times 0.9 \times 100$$

式中：

X—样品中粗多糖含量（以葡萄糖计），mg/100g；

m_1 —样品测定液中葡萄糖的质量，mg；

m_2 —样品质量，g；

V_1 —样品提取液总体积，mL；

V_2 —沉淀粗多糖所用样品提取液体积，mL；

V_3 —粗多糖溶液体积，mL；

V_4 —测定用样品液体积，mL；

0.9—葡萄糖换算为粗多糖的系数。

【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. 红曲：应符合GB 1886.19《食品安全国家标准 食品添加剂 红曲米》的规定。

2. 灵芝提取物

灵芝提取物的质量标准

项 目	指 标
来源	灵芝 应符合《中华人民共和国药典》的要求。
制法	本品以灵芝饮片为原料，经提取（加10倍水回流2次，每次2h，滤过）、浓缩、喷雾干燥（进风温度140~160℃，出风温度60~70℃）、过筛（80目）、包装等主要工艺加工制成。
提取率，%	10
感官要求	棕色至棕褐色粉末，具有灵芝子实体气味
粗多糖，%	≥10
水分，%	≤9
灰分，%	≤9
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
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

3. 丹参提取物

丹参取物的质量标准

项 目	指 标
来源	丹参 应符合《中华人民共和国药典》的要求。
制法	本品以丹参饮片为原料，经提取（加8倍95%乙醇回流2次，每次1h，滤过，合并滤液）、浓缩、减压干燥（60℃，0.08MPa）、粉碎、过筛（80目）、包装等主要工艺加工制成。
提取率，%	10
感官要求	红棕色粉末，具特有的滋味、气味
丹参酮Ⅱ _A ，%	≥2.0
水分，%	≤9
灰分，%	≤9
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
六六六，mg/kg	≤0.2
滴滴涕，mg/kg	≤0.2
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

4. 黑木耳提取物

黑木耳取物的质量标准

项 目	指 标
来源	黑木耳
制法	本品以黑木耳为原料，经粉碎、提取（加水100℃提取2次，第一次26倍2h，第二次15倍1.5h，滤过）、浓缩、喷雾干燥（进风230℃，出风90℃）、过筛（80目）、包装等主要工艺加工制成。
提取率，%	10
感官要求	黄色至棕褐色粉末，具特有的滋味、气味
粗多糖，%	≥25
水分，%	≤9
灰分，%	≤9
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
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

5. 糊精：应符合《中华人民共和国药典》的规定。

6. 硬脂酸镁：应符合《中华人民共和国药典》的规定。
