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G20220160

医嘉牌红曲丹参植物甾醇胶囊

【原料】 葛根、银杏叶、山楂、丹参、绞股蓝、植物甾醇、红曲粉、葡萄籽提取物

【辅料】 糊精

【生产工艺】 本品经提取（葛根、银杏叶、山楂、丹参、绞股蓝，70%乙醇回流提取2次，分别8倍量1.5h、6倍量1h）、过滤、浓缩、减压干燥（-0.06~-0.08MPa，60℃）、粉碎、过筛、混合、制粒、干燥、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	内容物呈粉红色至红棕色，色泽均匀
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，无破裂，内容物为颗粒及粉末
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
β -谷甾醇, g/100g	≥ 6.8	1 β -谷甾醇的测定
葛根素, g/100g	≥ 1.5	GB/T 22251
水分, %	≤ 9	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
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	2 桔青霉素的测定
黄曲霉毒素B ₁ , μg/kg	≤5.0	GB 5009.22
展青霉素, μg/kg	≤50	GB 5009.185
崩解时限, min	≤60	《中华人民共和国药典》

1 β-谷甾醇的测定

1.1 仪器

1.1.1 高效液相色谱仪, 带紫外检测器。

1.2 试剂

除非另有说明, 所有试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的一级水。

1.2.1 异丙醇: 色谱纯。

1.2.2 乙腈: 色谱纯。

1.2.3 乙醇。

1.2.4 β-谷甾醇对照品: 纯度≥90%。

1.3 色谱条件

1.3.1 色谱柱: ODS C₁₈液相色谱柱, 4.6mm×250mm, 5μm。

1.3.2 流动相: 乙腈+异丙醇(70+30, V/V)。

1.3.3 流速: 1mL/min。

1.3.4 柱温: 室温。

1.3.5 紫外检测波长: 210nm。

1.4 谷甾醇标准溶液: 精度称取β-谷甾醇对照品10mg, 移入10mL容量瓶中, 加入乙醇, 超声波振荡助溶, 并用乙醇定容到10mL, 此为浓度1.0mg/mL的标准储备液。

1.5 样品溶液制备: 称取均匀样品0.25g(精确到0.1mg), 置于50mL容量瓶中, 加入40mL乙醇, 超声波振荡60min取出, 冷却后用乙醇定容至刻度, 摇匀后经0.45μm微孔膜过滤, 清液待分析。

1.6 测定

1.6.1 标准工作曲线绘制: 精度吸取β-谷甾醇标准溶液(1.0mg/mL) 1.0、2.0、5.0mL, 分别置于10mL容量瓶中, 用乙醇定容, 摇匀。分别取10μL标准工作系列溶液进样分析, 以测得的β-谷甾醇的峰面积, 分别对β-谷甾醇的浓度绘制标准曲线。

1.6.2 样品测定: 取样品滤液10μL进液相色谱仪分离测定, 根据色谱峰保留时间定性, 以外标峰面积法进行定量。

1.7 结果计算

根据待测样品色谱峰面积, 由标准曲线回归方程式的样液中β-谷甾醇含量, 计算出样品中的含量。

样品中β-谷甾醇含量按下式进行计算

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000}$$

式中:

X—样品中β-谷甾醇的含量, g/100g;

C—标准溶液中β-谷甾醇标准品的浓度, mg/mL;

V—样品定容体积, mL;

m—样品质量, g。

2 桔青霉素的测定

2.1 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。

2.2 试剂

- 2.2.1 乙腈：HPLC级。
- 2.2.2 磷酸：分析纯或色谱纯。
- 2.2.3 甲醇：HPLC级。
- 2.2.4 甲苯：分析纯。
- 2.2.5 乙酸乙酯：分析纯。
- 2.2.6 甲酸：分析纯。
- 2.2.7 水：去离子水。
- 2.2.8 乙醇：色谱纯。
- 2.2.9 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。
- 2.2.10 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]。

2.3 仪器

- 2.3.1 高效液相色谱仪。
- 2.3.2 色谱柱：EcLipse XDB C₁₈反相色谱柱，250×4.6mm，粒度直径为5um。
- 2.3.3 试样环：20μL。
- 2.3.4 检测器：荧光检测器，λ_{ex}=331，λ_{em}=500。
- 2.3.5 VCX400超声波细胞破碎仪。
- 2.3.6 电子天平：千分之一或万分之一。
- 2.3.7 pH计：精度为0.01。
- 2.3.8 匀浆器。
- 2.3.9 离心机。
- 2.3.10 旋转蒸发器。
- 2.3.11 分光光度计。
- 2.3.12 0.45um的微孔氟滤膜。
- 2.3.13 具塞试管。
- 2.3.14 烧杯。
- 2.3.15 比色管。

2.4 分析步骤

2.4.1 桔青霉素的提取

2.4.1.1 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，记录产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，残渣中别加入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。

2.4.1.2 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(其间不断振摇)，3000rpm离心15min，上清液微滤后取20μL进行HPLC分析。

2.4.2 高压液相色谱测定：高压液相色谱分析：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，R²=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。

2.4.3 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。

2.4.3.1 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)

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

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)

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

式中：

X—样品中桔青霉素浓度(mg/kg)；

D_s—稀释倍数(V/W)；

X₁—标样浓度，mg/L；

Y₁—标样峰面积；

Y₂—样品峰面积；

W₁—样品重量，g；

V—固态萃取时的萃取剂总体积，mL。

2.4.3.2 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)

$$X=D_s \times (Y_2 + 0.2669) \div 89.72$$

式中：

D_L—稀释倍数，V_E/V_L；

V_E—液态萃时总体积，mL；

V_L—发酵液体积，mL；

其余参数同固体样品计算方法。

2.4.4 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。

2.5 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
洛伐他汀，mg/100g	86~158	1 洛伐他汀的测定
总黄酮（以芦丁计），g/100g	≥0.5	2 总黄酮的测定

1 洛伐他汀的测定

1.1 原理：将本品用75%乙醇超声提取其中的洛伐他汀，离心去除不溶残渣，取上清液用反相高效液相色谱分离出内酯（闭环）及酸式（开环）洛伐他汀，并用紫外检测器在238nm波长下检测。利用被测组分与

标准品的保留时间定性，利用被测组分峰面积与标准品的峰面积之比进行定量

1.2 试剂

- 1.2.1 甲醇：色谱纯。
- 1.2.2 无水乙醇：分析纯。
- 1.2.3 磷酸：分析纯。
- 1.2.4 氢氧化钠：分析纯。
- 1.2.5 洛伐他汀标准品：购自中国食品药品检定研究院；规格100mg，含量 $\geq 98.0\%$ 。

1.3 仪器

- 1.3.1 高效液相色谱仪。
- 1.3.2 紫外检测器（UV）。
- 1.3.3 低速离心机。
- 1.3.4 超纯水系统。
- 1.3.5 超声波清洗器。
- 1.3.6 精密分析天平。

1.4 液相色谱参考条件。

- 1.4.1 色谱柱： C_{18} 柱，250mm $\times$ 4.6mm。
- 1.4.2 柱温：室温20~25 $^{\circ}C$ 。
- 1.4.3 紫外检测器：238nm检测波长。
- 1.4.4 流动相：甲醇：水：磷酸=385：115：0.14（体积分数）。
- 1.4.5 流速：1.0mL/min。
- 1.4.6 进样量：20 μ L。

1.5 标准曲线的制备

- 1.5.1 洛伐他汀标准贮备液：准确称取洛伐他汀（内酯）标准品40.0mg，以75%乙醇定容至100mL。此溶液浓度为400 μ g/mL。
- 1.5.2 准确量取洛伐他汀标准贮备液1mL，以75%乙醇溶液定容10mL。此溶液浓度为40 μ g/mL。

1.6 样品处理

- 1.6.1 试样溶液制备：取供试品20粒，倾出内容物，研细。精确称取细粉0.5g，于50mL容量瓶中，加入30mL75%乙醇（体积分数），摇匀，室温下超声50min。加75%乙醇至接近刻度，再超声10min，之后冷却至室温，用75%乙醇定容至50mL。以3500r/min的旋转速度离心10min。取上清液经0.45 μ m微孔滤膜过滤，滤液待用。
- 1.6.2 定性用酸式（开环）洛伐他汀的制备：称取洛伐他汀（内酯）标准品4mg，以0.2mol/L氢氧化钠溶液定容至100mL，在50 $^{\circ}C$ 条件下超声转化1h，放置到室温后再放置1h。

1.7 样品测定

- 1.7.1 标准曲线制备：配制浓度为0.1、1、10、30、75、150、300 μ g/mL洛伐他汀标准溶液，分析时，用洗脱液平衡分析柱，基线稳定后将不同浓度的洛伐他汀标准液进行HPLC分析，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，以洛伐他汀含量为横坐标作图，线性关系良好，r在0.9995以上时，进行后续试样测定。
- 1.7.2 色谱分析：将处理好的试样提取液20 μ L进样，与标准溶液保留时间对照定性，用被测组分内酯及酸式洛伐他汀峰面积之和与标准洛伐他汀（内酯）的峰面积之比进行定量。

1.8 结果计算

1.8.1 公式

$$X = \frac{(h_1 + h_2) \times c \times V \times 100}{h_3 \times m}$$

式中：

- X—样品中莫拉克林K的含量，mg/100g；
- h_1 —样品溶液内酯式洛伐他汀峰面积；
- h_2 —样品溶液酸式洛伐他汀峰面积；
- c—标准洛伐他汀（内酯）溶液浓度，mg/mL；
- V—样品溶液稀释体积，mL；
- h_3 —标准洛伐他汀（内酯）溶液峰面积；
- m—取样量，g。

1.8.2 结果要求：检测结果有效数字保留至整数位。平行样测定相对误差±5%。

2 总黄酮的测定

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：分析醇。

2.1.4 甲醇：分析醇。

2.2 分析步骤

2.2.1 试样处理：取胶囊内容物适量，精密称定，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。

2.2.3 计算和结果的表示：

$$X = \frac{A \times V_2 \times 100}{V_1 \times M \times 1000 \times 1000}$$

式中：

X—试样中总黄酮含量，g/100g；

A—由标准曲线算得被测液中黄酮量，μg；

M—试样质量，g；

V₁—测定用试样体积，mL；

V₂—试样定容总体积，mL。

计算结果保留二位有效数字。

【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. 葛根：应符合《中华人民共和国药典》的规定。

2. 银杏叶：应符合《中华人民共和国药典》的规定。

3. 山楂：应符合《中华人民共和国药典》的规定。

4. 丹参：应符合《中华人民共和国药典》的规定。

5. 绞股蓝：应符合《山东省中药材标准》的规定。

6. 植物甾醇：应符合《关于批准DHA藻油、棉籽低聚糖等7种物品为新资源食品及其他相关规定的公告》（2010年第3号）的规定。

7. 红曲粉：应符合QB/T 2847《功能性红曲米（粉）》的规定。

8. 葡萄籽提取物

项 目	指 标
来源	葡萄籽
制法	经提取(6倍量70%乙醇60℃提取2次，每次2h)、过滤、浓缩、萃取(加等体积乙酸乙酯萃取4次，收集上层液)、真空干燥(40℃)、粉碎、包装等主要工艺制成
得率，%	4.5~6.5
感官要求	棕黄色至红棕色粉末，色泽均匀，具特殊气味和味道，无肉眼可见的外来杂质
水分，%	≤5.0
灰分，%	≤5.0
粒径（80目的通过率），%	≥95
原花青素含量，%	≥50
铅（以Pb计），mg/kg	≤1.0

总砷（以As计），mg/kg	≤0.5
总汞（以Hg计），mg/kg	≤0.3
六六六，mg/kg	≤0.1
滴滴涕，mg/kg	≤0.1
菌落总数，CFU/g	≤1000
霉菌和酵母，CFU/g	≤50
大肠菌群，MPN/g	≤0.92
金黄色葡萄球菌	≤0/25g
沙门氏菌	≤0/25g

9. 糊精：应符合《中华人民共和国药典》的规定。