附件3

《保健食品原料目录 螺旋藻》

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **原料名称** |  **每日用量** | **功效** |
| **名称** | **用量范围** | **适宜人群** | **不适宜人群** | **注意事项** |
| 螺旋藻 | 3-4g | 免疫力低下者 | 婴幼儿、孕妇及乳母、过敏体质人群 |  | 增强免疫力 |

螺旋藻原料技术要求

**【**来源**】**

螺旋藻为钝顶螺旋藻（*Arthrospira platensis*）和极大螺旋藻（*Arthrospira maxima*）经人工培养、采收、清洗的藻泥，经过喷雾干燥，或者其他干燥方法并经杀菌获得的干粉。

【感官要求】

应符合表1规定。

表1 感官指标

|  |  |
| --- | --- |
| 项目 | 要求 |
| 色泽 | 蓝绿色至墨绿色 |
| 滋味、气味 | 无异味，略带藻腥味 |
| 状态 | 均匀干燥疏松粉末，无结块，无正常视力可见外来杂质 |

【鉴别】

取少量样品于水中，充分震荡搅拌使藻粉颗粒分散，显微镜视野中应呈分散、绿色的S形、L形、C形或螺旋形的藻丝体，不得有明显异物。

【理化指标】

应符合表2规定。

表2 理化指标

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 指标 | 检验方法 |
| 水分，% ≤ | 7.0 | GB 5009.3第一法 |
| 总灰分，% ≤ | 7.0 | GB 5009.4 |
| 蛋白质，％ ≥ | 55.0 | GB 5009.5 |
| 铅（以Pb计）， mg/kg ≤ | 2.0 | GB 5009.12 |
| 砷（以As计）， mg/kg ≤ | 1.0 | GB 5009.11 |
| 汞（以Hg计）， mg/kg ≤ | 0.3 | GB 5009.17 |
| 镉（以Cd计）， mg/kg ≤ | 0.2 | GB 5009.15 |

【微生物指标】

应符合表3规定。

表3 微生物指标

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 指标 | 检验方法 |
| 菌落总数，CFU/g ≤ | 30000 | GB 4789.2 |
| 霉菌和酵母，CFU/g ≤ | 50 | GB 4789.15 |
| 大肠菌群，MPN/g ≤ | 0.92 | GB 4789.3 MPN计数法 |
| 沙门氏菌 ≤ | 0/25g | GB 4789.4 |
| 金黄色葡萄球菌 ≤ | 0/25g | GB 4789.10 |
| 副溶血性弧菌，MPN/g | 采样量为25g | GB/T 4789.7 |
| n | c | m | M |
| 5 | 1 | 100 MPN/g | 1000 MPN/g |

注：n为同一批次产品应采集的样品件数；c为最大可允许超出m值的样品数；m为致病菌指标可接受水平的限量值；M为致病菌指标的最高安全限量值。

【标志性成分指标】

 应符合表4规定。

表4标志性成分指标

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 指标 | 检验方法 |
| β-胡萝卜素，g/kg ≥ | 0.20 | 1β-胡萝卜素的测定 |
| 藻蓝蛋白，% ≥ | 5.00 | 2藻蓝蛋白的测定 |

1β-胡萝卜素的测定

1.1试剂和材料

1.1.1 氢氧化钾溶液:称固体氢氧化钾500g,加入500mL水溶解。临用前配制。

1.1.2 无水硫酸钠(Na2SO4)，分析纯

1.1.3 抗坏血酸(C6H8O6)，分析纯

1.1.4 石油醚：沸程30℃~60℃，分析纯

1.1.5 甲醇(CH4O)，色谱纯

1.1.6 乙腈(C2H3N)，色谱纯

1.1.7 甲基叔丁基醚[CH3OC(CH3)3]，色谱纯

1.1.8 二氯甲烷(CH2Cl2)，色谱纯

1.1.9 无水乙醇(C2H6O)，优级纯

1.1.10 水，符合GB/T6682规定的一级水

1.1.11 碘溶液(I2):0.5 mol/L浓度

1.1.12 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(C15H24O，BHT)

1.2 仪器和设备

1.2.1 匀浆机

1.2.2 高速粉碎机

1.2.3 恒温振荡水浴箱（控温精度±1℃）

1.2.4 旋转蒸发器

1.2.5 氮吹仪

1.2.6 紫外-可见光分光光度计

1.2.7 高效液相色谱仪(带紫外检测器)

1.3 对照品溶液制备

1.3.1 β-胡萝卜素标准储备液(500μg/mL)

准确称取β-胡萝卜素标准品25mg(精确到0.1mg)，加入0.125gBHT，用二氯甲烷溶解，转移至50mL棕色容量瓶中定容至刻度。

1.3.2 β-胡萝卜素标准中间液(100 μg/mL)

从β-胡萝卜素标准储备液中准确移取10.0 mL溶液于50mL棕色容量瓶中，用二氯甲烷定容至刻度。

1.3.3 β-胡萝卜素标准工作液

从β-胡萝卜素标准中间液中分别准确移取0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、10.00 mL溶液至6个100 mL棕色容量瓶。 用二氯甲烷定容至刻度，得到浓度为0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、3.0 μg/mL、4.0 μg/mL、10 μg/mL的系列标准工作液。

1.3.4 碘乙醇溶液(0.05 mol/L)

吸取5 mL碘溶液,用乙醇稀释至50 mL,混匀。

1.3.5 异构化β-胡萝卜素溶液

取10 mLβ-胡萝卜素标准储备液于烧杯中，加入20 μL碘乙醇溶液，摇匀后于日光下或距离40 W日光灯30 cm处照射15 min，用二氯甲烷稀释至50 mL。摇匀后过0.45 μm滤膜，备HPLC色谱分析用。

1.4供试品溶液制备

1.4.1 预处理

精确称取1g~5g (精确至0.001g)螺旋藻粉，转至250mL锥形瓶中，加入1g抗坏血酸、75mL无水乙醇，于60℃±1℃水浴振荡30min。

1.4.2 皂化

加入25mL氢氧化钾溶液，盖上瓶塞。置于已预热至53℃±2℃恒温振荡水浴箱中，皂化30min。取出，静置，冷却到室温。

1.4.3 试样萃取

将皂化液转入500mL分液漏斗中，加入100mL石油醚，轻轻摇动，排气，盖好瓶塞，室温下振荡，10min后静置分层，将水相转入另一分液漏斗中按上述方法进行第二次提取。合并有机相，用水洗至近中性。弃水相，有机相通过无水硫酸钠过滤脱水。滤液收入500mL蒸发瓶中，于旋转蒸发器上40℃±2℃减压浓缩，近干。用氮气吹干，用移液管准确加入5.0mL二氯甲烷，盖上瓶塞，充分溶解提取物。经0.45 μm膜过滤后，弃出初始约1mL滤液后收集至进样瓶中，备用。

1.5 色谱条件

a) 色谱柱：C30柱，柱长150mm，内径4.6mm，粒径5μm，或等效柱；

b) 流动相：A相：甲醇:乙腈:水=73.5:24.5:2；

B相：甲基叔丁基醚；

表5 梯度程序

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间/min  | 0  | 15  | 18  | 19  | 20  | 22 |
| A%  | 100  | 59  | 20  | 20  | 0  | 100 |
| B%  | 0  | 41  | 80  | 80  | 100  | 0 |

c) 流速：1.0mL/min；

d) 检测波长：450nm；

e) 柱温：30 ℃±1 ℃；

f) 进样体积：20μL。

1.6 测定

在相同色谱条件下,将待测液注入液相色谱仪中,以保留时间定性,根据峰面积采用外标法定量,β-胡萝卜素根据全反式β-胡萝卜素响应因子进行计算。

1.7 全反式β-胡萝卜素色谱纯度的计算

1.7.1 β-胡萝卜素异构体保留时间的确认

分别取β-胡萝卜素标准中间液(100 μg/mL)和异构化β-胡萝卜素溶液,按照色谱条件注入HPLC仪进行色谱分析。根据β-胡萝卜素标准中间液的色谱图确认全反式β-胡萝卜素的保留时间；对比β-胡萝卜素标准中间液和异构化β-胡萝卜素溶液色谱图中各峰面积变化，以及与全反式β-胡萝卜素的位置关系确认顺式β-胡萝卜素异构体的保留时间：全反式β-胡萝卜素前较大的色谱峰为13-顺式-β-胡萝卜素，紧邻全反式β-胡萝卜素后较大的色谱峰为9-顺式-β-胡萝卜素，13-顺式-β-胡萝卜素前是15-顺式-β-胡萝卜素，另外可能还有其他较小的顺式结构色谱峰，色谱图见图。

1.7.2 全反式β反胡萝卜素标准液色谱纯度的计算

取β-胡萝卜素标准工作液(3 μg/mL),按照色谱条件进行HPLC分析,重复进样6次。计算全反式β-胡萝卜素色谱峰的峰面积、全反式与上述各顺式结构的峰面积总和,全反式β-胡萝卜素色谱纯度（*CP*）按公式计算。

$$CP=\frac{\overbar{A}\_{all-E}}{\overbar{A}\_{sum}}×100％$$

*CP*———全反式β-胡萝卜素色谱纯度，%；

*Ᾱ*all-*E*———全反式β-胡萝卜素色谱峰峰面积平均值，单位为峰面积(AU)；

*Ᾱ*sum———全反式β-胡萝卜素及各顺式结构峰面积总和平均值,单位为峰面积(AU)。

1.8 结果计算

计算全反式β-胡萝卜素响应因子

将β-胡萝卜素混合标准工作液注入HPLC仪中(色谱图见图1),根据保留时间定性,测定β-胡萝卜素各异构体峰面积。

β-胡萝卜素根据标准工作液标定浓度、全反式β-胡萝卜素6次测定峰面积平均值、全反式β-胡萝卜素色谱纯度（*CP*）,按公式计算全反式β-胡萝卜素响应因子。



式中:

*RF* ———全反式β-胡萝卜素响应因子,单位为峰面积毫升每微克(AU·mL/μg)；

*Ᾱall-E* ———全反式β-胡萝卜素标准工作液色谱峰峰面积平均值，单位为峰面积(AU)；

*ρ* ———β-胡萝卜素标准工作液标定浓度,单位为微克每毫升(μg/mL)；

*CP* ———全反式β-胡萝卜素的色谱纯度，%。

试样中β-胡萝卜素含量按下公式计算:



式中:

*Xβ* ———试样中β-胡萝卜素的含量,单位为微克每百克(μg/100g);

*Aall-E* ———试样待测液中全反式β-胡萝卜素峰面积,单位为峰面积(AU);

*A9Z* ———试样待测液中9-顺式-β-胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

*A13Z* ———试样待测液中13-顺式-β-胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

1.2 ———13-顺式-β-胡萝卜素的相对校正因子;

*A15Z* ———试样待测液中15-顺式-β-胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

1.4 ———15-顺式-β-胡萝卜素的相对校正因子;

*AxZ* ———试样待测液中其他顺式β-胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

*V* ———试样液定容体积,单位为毫升(mL);

100 ———将结果表示为微克每百克(μg/100g)的系数;

*RF* ———全反式β-胡萝卜素响应因子,单位为峰面积毫升每微克(AU·mL/μg);

*m* ———试样质量,单位为克(g)。

注1:由于β-胡萝卜素各异构体百分吸光系数不同(见附录D),所以在β-胡萝卜素计算过程中,需采用相对校正因子对结果进行校正。

注2:如果试样中其他顺式β-胡萝卜素含量较低,可不进行计算。

1.9 色谱图



图1 β-胡萝卜素检测色谱图

说明：

Ⅰ——15-顺式-β-胡萝卜素；

Ⅱ——13-顺式-β-胡萝卜素；

Ⅲ——全反式α-胡萝卜素；

Ⅳ——全反式β-胡萝卜素；

Ⅴ——9-顺式-β-胡萝卜素。

2 藻蓝蛋白的测定

2.1试剂

磷酸盐缓冲溶液:将0.1 mol/L磷酸二氢钾溶液与0.1 mol/L磷酸氢二钾溶液(45+55V/V) 混合，溶液pH值为7.0。

2.2仪器和设备

2.2.1 分光光度计

2.2.2 超声波振荡器

2.2.3 离心机（3000 r/min）

2.2.4 低温冰箱（-20 ℃）

2.2.5 离心管（50 mL）。

2.3 供试品溶液制备

称取试样0.25-0.5g（精确至0.0001g）。用缓冲液（2.1项）溶解，超声振荡5 min.定容于250 mL容量瓶中，摇匀。将溶液全部转入250 mL广口塑料瓶，置于-20℃冰箱内冷冻12h(或放置过夜)。取出解冻，摇匀。

2.4 测定

取部分溶液于离心管中，在3000r/min转速下离心15min取上层清液.1 cm比色皿，在分光光度计上分别测定620 nm、652 nm、562 nm处的吸光度，用缓冲液(2.1项)做空白。

2.5 结果计算

$$X\_{1}=0.187A\_{620}-0.089A\_{652}$$

$$X\_{2}=0.196A\_{652}-0.041A\_{620}$$

$$X\_{3}=0.104A\_{562}-0.251X\_{1}-0.088X\_{2}$$

$$X\_{4}=\frac{(X\_{1}+X\_{2}+X\_{3})×V×100}{m×1000}$$

*X1*——测试液中藻蓝素的含量，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

*X2*——测试液中异藻蓝素的含量，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

*X3*——测试液中藻红素的含量，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

*A*——相应波长处(620nm,652nm,562nm)测得吸光值；

*X4*——试样中藻蓝蛋白的质量分数，单位为克每100克(g/100g)；

*V*——样品定容体积，单位为毫升(mL)。

*m*——试样质量，单位为克(g)。

测定结果取平行试验结果的算术平均值，保留小数点后第二位。

平行试验允许误差(相对)不大于4%。

注2 整个操作过程须注意避光，分光光度测定应在15 min 内完成。

【储存】包装应密封、牢固、防潮、不易破损，贮藏在遮荫、干燥、通风的库房内

**【**产品的剂型**】**片剂、颗粒剂、硬胶囊

——————————