

国家市场监督管理总局
保健食品产品技术要求

国食健注G20080249

同仁堂牌人参灵芝酒

【原料】 人参、怀牛膝、枸杞子、酒黄精、覆盆子、灵芝、龙眼肉、炙淫羊藿、佛手

【辅料】 白酒、蜂蜜、冰糖、纯化水、红曲米

【生产工艺】 本品经粉碎、提取（加白酒渗漉，流速1~3mL/kg/min）、配制、过滤、灌装、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】 玻璃瓶应符合YBB00272002的规定；瓶盖应符合BB/T 0034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	棕红色
滋味、气味	酒香浓郁，具药香味
性状	澄清液体，允许有少量沉淀
杂质	无肉眼可见外来杂质

【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
酒精度，%（V/V）	27±1	GB 5009.225
总固体，g/100mL	≥10.0	《中华人民共和国药典》
甲醇，g/L（以100%酒精度折算）	≤0.6	GB 5009.266
铅（以Pb计），mg/kg	≤0.50	GB 5009.12
总砷（以As计），mg/kg	≤0.30	GB 5009.11
锰（以Mn计），mg/L	≤2.0	GB 5009.242
六六六，mg/L	≤0.10	GB/T 5009.19

滴滴涕, mg/L	≤0.10	GB/T 5009.19
黄曲霉毒素B ₁ , μg/kg	≤10.0	GB 5009.23
桔青霉素, μg/kg	不得检出	1 桔青霉素的测定
氰化物（以HCN计）, mg/L （以100%酒精度折算）	≤8.0	GB 5009.36

1 红曲产品中桔青霉素的测定（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/mL	≤100	GB 4789.2
大肠菌群，MPN/mL	≤0.43	GB 4789.3 “MPN计数法”
霉菌，CFU/mL	≤10	GB 4789.15
酵母，CFU/mL	≤10	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
总皂苷（以人参皂苷Re计），mg/100mL	≥20.0	1 总皂苷的测定
粗多糖（以葡聚糖计），mg/100mL	≥10.0	2 粗多糖的测定
淫羊藿苷，μg/mL	≥4.0	3 淫羊藿苷的测定

1 总皂苷的测定（来源于《保健食品检验与评价技术规范》（2003年版））

1.1 试剂

- 1.1.1 Amberlite-XAD-2大孔树脂，Sigma化学公司、U. S. A. 。
- 1.1.2 正丁醇：分析纯。
- 1.1.3 乙醇：分析纯。
- 1.1.4 中性氧化铝：层析用，100～200目。
- 1.1.5 人参皂苷Re：购自中国食品药品检定研究院。
- 1.1.6 香草醛溶液：称取5g香草醛，加冰乙酸溶解并定容至100mL。
- 1.1.7 高氯酸：分析纯
- 1.1.8 冰乙酸：分析纯
- 1.1.9 人参皂苷Re标准溶液：精确称取人参皂苷Re标准品0.020g，用甲醇溶解并定容至10.0mL，即每毫升含人参皂苷Re2.0mg。

1.2 仪器

- 1.2.1 比色计
- 1.2.2 层析柱

1.3 实验步骤

1.3.1 试样处理

- 1.3.1.1 固体试样：称取1.000g左右的试样（根据试样含人参量定），置于100mL容量瓶中，加少量水，超声30min，再用水定容至100mL，摇匀，放置，吸取上清液1.0mL进行柱层析。
- 1.3.1.2 液体试样：含乙醇的补酒类保健食品，吸取1.0mL试样放水浴挥干，用水浴溶解残渣，用此液进行柱层析。
非乙醇类的液体试样：吸取1.0mL试样（假如浓度高、或颜色深，需稀释一定体积后再取1.0mL）进行柱层析。

- 1.3.2 柱层析：用10mL注射器作层析管，内装3cmAmberlite-XAD-2大孔树脂，上加1cm中性氧化铝。先用25mL70%乙醇洗柱，弃去洗脱液，再用25mL水洗柱，弃去洗脱液，精确加入1.0mL已处理好的试样溶液（见1.3.1），用25mL水洗柱，弃去洗脱液，用25mL70%乙醇洗脱人参皂苷，收集洗脱液于蒸发皿中，置于60℃水浴挥干。以此作显色用。
- 1.3.3 显色：在上述已挥干的蒸发皿中准确加入0.2mL5%香草醛冰乙酸溶液，转动蒸发皿，使残渣都溶解，再加0.8mL高氯酸，混匀后移入5mL带塞刻度离心管中，60℃水浴上加热10min，取出，冰浴冷却后，准确加入冰乙酸5.0mL，摇匀后，以1cm比色池于560nm波长处与标准管一起进行比色测定。
- 1.3.4 标准管：吸取人参皂苷Re标准溶液（2.0mg/mL）100μL放蒸发皿中，放在水浴挥干（低于60℃），或热风吹干（勿使过热），以下操作从“1.3.2柱层析…”起，与试样相同。测定吸光度值。

1.4 计算：

$$X = \frac{A_1}{A_2} \times C \times \frac{V}{m} \times \frac{100}{1000} \times \frac{1}{1000}$$

式中：

X—试样中总皂苷含量（以人参皂苷Re计），g/100g；

A_1 —被测液的吸光度值；
 A_2 —标准液的吸光度值；
 C —标准管人参皂苷Re的量， μg ；
 V —试样稀释体积，mL；
 m —试样质量，g。

计算结果保留二位有效数字。

2 粗多糖的测定

2.1 仪器

2.1.1 分光光度计。

2.1.2 离心机。

2.1.3 旋转混匀器。

2.2 试剂

除特殊注明外，本方法所用试剂均为分析纯，所用水为去离子水或同等纯度蒸馏水。

2.2.1 乙醇溶液（80%）：20mL水中加入无水乙醇80mL，混匀。

2.2.2 氢氧化钠溶液（100g/L）：称取100g氢氧化钠，加水溶解并稀释至1L，加入固体无水硫酸钠至饱和，备用。

2.2.3 铜试剂储备液：称取3.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、30.0g柠檬酸钠，加水溶解并稀释至1L，混匀，备用。

2.2.4 铜试剂溶液：取铜试剂储备液50mL，加水50mL，混匀后加入固体无水硫酸钠12.5g并使其溶解。临用新配。

2.2.5 洗涤剂：取水50mL，加入10mL铜试剂溶液、10mL氢氧化钠溶液，混匀。

2.2.6 硫酸溶液（10%）：取100mL浓硫酸加入到800mL左右水中，混匀，冷却后稀释至1L。

2.2.7 苯酚溶液（50g/L）：称取精制苯酚5.0g，加水溶解并稀释至100mL，混匀。溶液置冰箱中可保存1个月。

2.2.8 葡聚糖标准储备液：准确称取相对分子质量 5×10^5 已干燥至恒重的葡聚糖标准品0.5000g，加水溶解并定容至50mL，混匀，置冰箱中保存。此溶液1mL含葡聚糖10.0mg。

2.2.9 葡聚糖标准使用液：吸取葡聚糖标准储备液1.0mL，置于100mL容量瓶中，加水至刻度，置冰箱中保存。此溶液1mL含葡聚糖0.10mg。

2.3 样品处理

2.3.1 沉淀粗多糖：准确吸取样品5.0mL，置于50mL离心管中，加入无水乙醇20mL，混匀5min后，以3000 r/min离心5min，弃去上清液。残渣用80%乙醇溶液数毫升洗涤，离心后弃去上清液，反复操作3~4次。残渣用水溶解并定容至5.0mL，混匀后，供沉淀葡聚糖。

2.3.2 沉淀葡聚糖：准确吸取2.3.1项终溶液2mL置于20mL离心管中，加入100g/L氢氧化钠溶液2.0mL、铜试剂溶液2.0mL，沸水浴中煮沸2min，冷却，以3000r/min离心5min，弃去上清液。残渣用洗涤剂数毫升洗涤，离心后弃去上清液，反复操作3次，残渣用10%硫酸溶液2.0mL溶解并转移至50mL容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。此溶液为样品测定液。

2.4 标准曲线的绘制：准确吸取葡聚糖标准使用液0、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mL（相当于0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10mg）分别置于25mL比色管中，准确补充水至2.0mL，加入50g/L苯酚溶液1.0mL，在旋转混匀器上混匀，小心加入浓硫酸10.0mL，于旋转混匀器上小心混匀，置沸水浴中煮沸2min，冷却后用分光光度计在485nm波长处，以试剂空白溶液为参比，1cm比色皿测定吸光度值。以葡聚糖浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

2.5 样品测定：准确吸取样品测定液2.0mL置于25mL比色管中，加入50g/L苯酚溶液1.0mL，在旋转混匀器上混匀，小心加入浓硫酸10.0mL于旋转混匀器上小心混匀，置沸水浴中煮沸2min，冷却至室温，用分光光度计在485nm波长处，以试剂空白为参比，1cm比色皿测定吸光度值。从标准曲线上查出葡聚糖含量，计算样品中粗多糖含量。同时做样品空白实验。

2.6 结果计算

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \times V_1 \times V_3 \times V_5}{m_3 \times V_2 \times V_4 \times V_6}$$

式中：

X —样品中粗多糖含量（以葡聚糖计），mg/mL；

m_1 —样品测定液中葡聚糖的质量, mg;
 m_2 —样品空白液中葡聚糖的质量, mg;
 m_3 —样品体积, mL;
 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 —沉淀葡聚糖所用粗多糖溶液体积, mL;
 V_5 —样品测定液总体积, mL;
 V_6 —测定用样品测定溶液体积, mL。

3 淫羊藿苷的测定

3.1 仪器

3.1.1 HPLC系统: 附紫外检测器, Kromasil C₁₈色谱柱(4.6×150mm)。

3.1.2 实验室常用玻璃仪器。

3.1.3 超声波提取器。

3.2 试剂

3.2.1 淫羊藿苷标准溶液: 用甲醇配制淫羊藿苷(购于中国食品药品检定研究院, 供含量测定用)标准溶液0.50mg/mL, 此液为储备液, 在冰箱中密闭储存可保存6个月。

3.2.2 乙腈: 色谱纯。

3.2.3 甲醇: 色谱纯。

3.3 色谱条件

3.3.1 流动相: 乙腈-水=26:74。

3.3.2 流速: 1mL/min。

3.3.3 检测波长: 270nm。

3.3.4 进样量: 20 μL。

3.3.5 柱温: 常温。

3.4 样品处理: 吸取样品1mL, 滤液过0.45μm滤膜。即为样品处理液。

3.5 标准曲线绘制: 用上述淫羊藿苷标准溶液配置淫羊藿苷浓度为3.2、6.4、12.8、19.2、25.6、32.0 μg/mL的工作液, 分别精密吸取20μL, 注入液相色谱仪, 测定, 并绘制标准曲线。

3.6 样品测定: 精密吸取样品处理液20μL, 注入液相色谱仪, 测定, 以相对保留时间定性, 峰面积定量。

【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“酒剂”的规定。

【原辅料质量要求】

1. 人参、怀牛膝、枸杞子、酒黄精、覆盆子、灵芝、龙眼肉、炙淫羊藿、佛手、蜂蜜、纯化水: 应符合《中华人民共和国药典》的规定。
 2. 白酒: 应符合GB/T 10781.2《清香型白酒》的规定。
 3. 冰糖: 应符合QB/T 1174《多晶体冰糖》的规定。
 4. 红曲米: 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。
-