

## 《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	
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				
	n	c	m	M	GB/T 4789.7
	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(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 分析纯

1.1.3 抗坏血酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), 分析纯

1.1.4 石油醚: 沸程30°C~60°C, 分析纯

1.1.5 甲醇(CH<sub>4</sub>O), 色谱纯

1.1.6 乙腈(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), 色谱纯

1.1.7 甲基叔丁基醚[CH<sub>3</sub>OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 色谱纯

1.1.8 二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 色谱纯

1.1.9 无水乙醇(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), 优级纯

1.1.10 水, 符合GB/T6682规定的一级水

1.1.11 碘溶液(I<sub>2</sub>):0.5 mol/L浓度

1.1.12 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O, 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°C)

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°C±1°C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°C±2°C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°C±2°C 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 °C±1 °C;
- 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-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。

$$CP = \frac{\bar{A}_{all-E}}{\bar{A}_{sum}} \times 100\%$$

CP——全反式β-胡萝卜素色谱纯度, %;

$\bar{A}_{all-E}$ ——全反式β-胡萝卜素色谱峰峰面积平均值,单位为峰面积(AU);

$\bar{A}_{sum}$ ——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。

$$RF = \frac{\bar{A}_{all-E}}{\rho \times CP}$$

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);

$\bar{A}_{all-E}$  ——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);

$\rho$  —— $\beta$ -胡萝卜素标准工作液标定浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

CP ——全反式 $\beta$ -胡萝卜素的色谱纯度, %。

试样中 $\beta$ -胡萝卜素含量按下公式计算:

$$X_{\beta} = \frac{(A_{\text{all-E}} + A_{9Z} + A_{13Z} \times 1.2 + A_{15Z} \times 1.4 + A_{xZ}) \times V \times 100}{RF \times m}$$

式中:

$X_{\beta}$  ——试样中 $\beta$ -胡萝卜素的含量,单位为微克每百克( $\mu\text{g}/100\text{g}$ );

$A_{\text{all-E}}$  ——试样待测液中全反式 $\beta$ -胡萝卜素峰面积,单位为峰面积(AU);

$A_{9Z}$  ——试样待测液中 9-顺式- $\beta$ -胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

$A_{13Z}$  ——试样待测液中 13-顺式- $\beta$ -胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

1.2 ——13-顺式- $\beta$ -胡萝卜素的相对校正因子;

$A_{15Z}$  ——试样待测液中 15-顺式- $\beta$ -胡萝卜素的峰面积,单位为峰面积(AU);

1.4 ——15-顺式- $\beta$ -胡萝卜素的相对校正因子;

$A_{xZ}$  ——试样待测液中其他顺式 $\beta$ -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( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )的系数;

RF ——全反式 $\beta$ -胡萝卜素响应因子,单位为峰面积毫升每微克( $\text{AU} \cdot \text{mL}/\mu\text{g}$ );

$m$  ——试样质量,单位为克(g)。

注1:由于 $\beta$ -胡萝卜素各异构体百分吸光系数不同(见附录D),所以在 $\beta$ -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 $\beta$ -胡萝卜素含量较低,可不进行计算。

## 1.9 色谱图

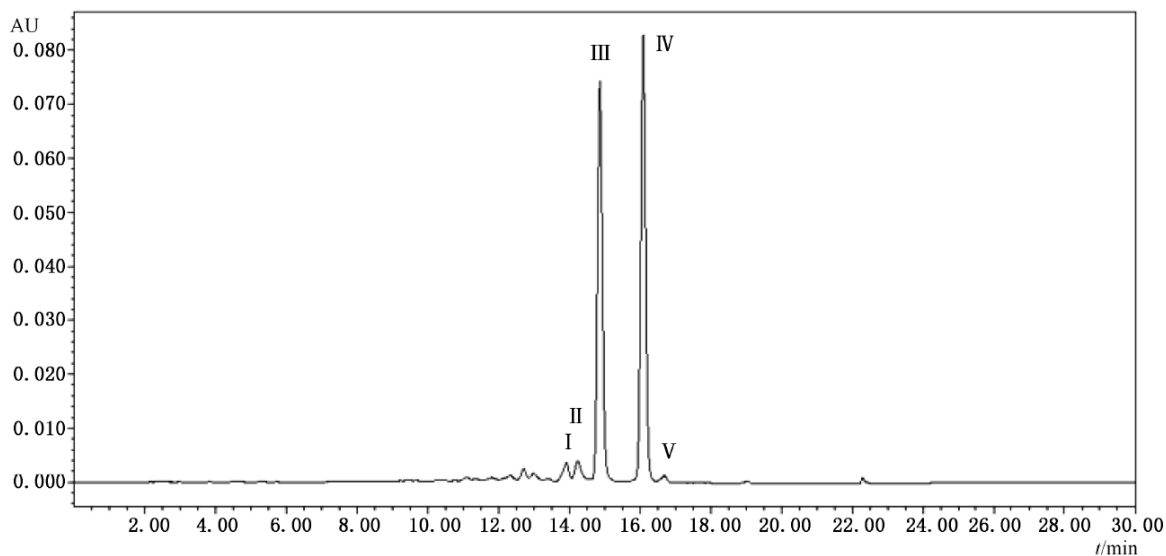


图1  $\beta$ -胡萝卜素检测色谱图

说明:

I ——15-顺式- $\beta$ -胡萝卜素;

II ——13-顺式- $\beta$ -胡萝卜素;

III ——全反式  $\alpha$ -胡萝卜素;

IV ——全反式  $\beta$ -胡萝卜素;

V ——9-顺式- $\beta$ -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 °C)

## 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°C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

$$\begin{aligned} X_1 &= 0.187A_{620} - 0.089A_{652} \\ X_2 &= 0.196A_{652} - 0.041A_{620} \\ X_3 &= 0.104A_{562} - 0.251X_1 - 0.088X_2 \\ X_4 &= \frac{(X_1 + X_2 + X_3) \times V \times 100}{m \times 1000} \end{aligned}$$

$X_1$ ——测试液中藻蓝素的含量, 单位为毫克每毫升(mg/mL);

$X_2$ ——测试液中异藻蓝素的含量, 单位为毫克每毫升(mg/mL);

$X_3$ ——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;

$X_4$ ——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

-----