

SW

国际商务标准

SW/T 6—2015

植物提取物 虾青素油

Astaxanthin Esters



2015-11-20 发布

2015-12-1 实施

中国医药保健品进出口商会

发布

前言

本标准由中国医药保健品进出口商会提出。

本标准由中华人民共和国商务部归口。

本标准由中国医药保健品进出口商会国际商务标准化技术委员会负责解释。

本标准由北京绿色金可生物技术股份有限公司负责起草。

本标准主要起草人：姚军芳、李艳梅、张培楠、侯翔燕、吴启林、李春华



国际商务标准

植物提取物 虾青素油

1 范围

本标准规定了虾青素油的技术要求、检验方法和标签、包装、运输、贮存要求。本标准适用于以人工培养的红球藻属雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 为原料经提取精制后,得到的虾青素油。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定

GB4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验

GB4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验霉菌和酵母计数

GB4789.38 食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠埃希氏菌计数

GB9685 食品容器、包装材料用添加剂使用卫生标准

中华人民共和国药典(2010年版)一部 附录IXE 重金属检查法

中华人民共和国药典(2010年版)一部 附录IXB 铅、镉、砷、汞、铜测定法

3 有效成分名称、结构式、分子式和相对分子质量

虾青素油(Astaxanthin Esters)中含有的有效成分是虾青素脂肪酸酯,即(3S, 3'S)-3,3'-二羟基-β, β-胡萝卜素-4,4'-二酮的脂肪酸酯。(3S, 3'S)-3,3'-二羟基-β, β-胡萝卜素-4,4'-二酮的结构式如下图所示,其分子式为C₄₀H₅₂O₄,分子量为596.84。

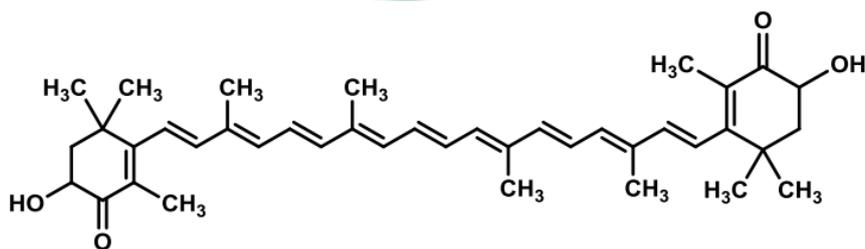


图1 (3S, 3'S)-3,3'-二羟基-β, β-胡萝卜素-4,4'-二酮结构式

虾青素油主要由3S,3'S 虾青素立体异构体以单酯、二酯和游离形式组成。游离虾青素是3和3'羟基位没有脂肪酸结合,虾青素单酯有一个脂肪酸结合到3或3'羟基的位置,虾青素二酯是3和3'羟基的位置各有一个脂肪酸结合。

4 技术要求

4.1 工艺要求

4.1.1 植物原料

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 为人工养殖, 在培养成熟后, 收获而得到。

4.1.2 工艺过程

雨生红球藻 → 超临界二氧化碳萃取或溶剂提取纯化 → 产品

4.2 产品要求

4.2.1 感官要求: 应符合表 1 的要求。

表 1 感官要求

项目	要求	检验方法
色泽	深红色	取适量样品置于清洁、干燥的比色管中, 在自然光线下, 观察其色泽和状态, 并嗅其气味。
气味	藻类特殊气味	
状态	油状物	

4.2.2 理化要求: 应符合表 2 规定。

表 2 理化要求

项目	指标	检验方法
鉴别	符合规定	附录 A 中 A.2
虾青素含量, %	≥5.0	附录 A 中 A.2
游离虾青素含量(面积归一化法), %	≤5.0	附录 A 中 A.3
水分, %	≤0.5	附录 A 中 A.4
重金属 (以 Pb 计), mg/kg	≤10	中华人民共和国药典 2010 版 一部附录 IXE
铅 (Pb), mg/kg	≤1.0	中华人民共和国药典 2010 版 一部附录 IXB
镉 (Cd), mg/kg	≤1.0	中华人民共和国药典 2010 版 一部附录 IXB
砷 (As), mg/kg	≤2.0	中华人民共和国药典 2010 版 一部附录 IXB
汞 (Hg), mg/kg	≤1.0	中华人民共和国药典 2010 版 一部附录 IXB

4.2.3 微生物指标要求: 应符合表 3 规定。

表 3 微生物指标

项目	指标	检验方法
细菌总数, cfu/g	<1000	GB 4789.2
霉菌及酵母菌数, cfu/g	<100	GB 4789.15
大肠埃希氏菌	不得检出	GB 4789.38
沙门氏菌	不得检出	GB4789.4

4.2.4 其他污染物

其他污染物限量要求，依据不同用途，应符合我国相关法规的规定。对于出口产品，应符合出口目的国相关法规的规定。

5. 检验方法

5.1 感官检验

按表 1 中规定进行检验。启开试样后，立即嗅其气味；另取试样适量置于无色 50mL 比色管中，在自然光线下，观察其色泽、外观，并检查有无异物。

5.2 理化检验

5.2.1 鉴别

鉴别按附录 A.2 中规定的检验方法进行测定，所得的供试品谱图中的三个主要的峰分别与对照品谱图中的 13-顺式虾青素，全反式虾青素和 9-顺式虾青素的保留时间一致。

5.2.2 虾青素含量

按附录 A.2 中规定的检验方法进行测定。

5.2.3 游离虾青素含量

按附录 A.3 中规定的检验方法进行测定。

5.2.4 水分

按附录 A.4 中规定的检测方法进行测定。

5.2.5 重金属（以 Pb 计）

按中华人民共和国药典（2010 年版）一部附录 IXE 重金属检查法进行测定。

5.2.6 铅

按中华人民共和国药典 2010 版一部附录 IXB 铅、镉、砷、汞、铜测定法进行测定。

5.2.7 镉

按中华人民共和国药典 2010 版一部附录 IXB 铅、镉、砷、汞、铜测定法进行测定。

5.2.8 砷

按中华人民共和国药典 2010 版一部附录 IXB 铅、镉、砷、汞、铜测定法进行测定。

5.2.9 汞

按中华人民共和国药典 2010 版一部附录 IXB 铅、镉、砷、汞、铜测定法进行测定。

5.3 微生物检验

5.3.1 细菌总数

按 GB4789.2 进行测定。

5.3.2 霉菌及酵母菌数

按 GB4789.15 进行测定

5.3.3 大肠埃希氏菌

按 GB4789.38 进行测定。

5.3.5 沙门氏菌

按 GB4789.4 进行测定。

6 包装、标签、运输、贮存

6.1 包装

包装材料应符合 GB 9685 食品容器、包装材料用添加剂使用卫生标准的要求。

6.2 标签

包装标签上应标注：产品名称、产品批号、产品规格、净含量、生产日期、保质期、生产厂名、

厂址、产地。

标签内容清晰可见，标签应粘贴牢固。

6.3 运输

运输时必须轻装轻卸，不得与有毒、有害和易污染物品混装载运，严防雨淋、暴晒。

6.4 贮存

产品应存放在干燥、通风、清洁的地方，堆码距墙壁和地面 20cm 以上、并有垫隔物。避免与有毒、有害、易腐、易污染等物品一起堆放。

6.5 保质期

在符合规定的贮运条件和包装完整、未经开启封口的情况下，保质期为两年。



附录 A

(规范性附录)

检验方法

A.1 一般规定

本标准所用试剂和水,在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和GB/T 6682规定的三级水。实验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.2 虾青素含量检测

A.2.1 方法提要

虾青素油主要含有虾青素单酯、虾青素二酯和游离虾青素。虾青素酯经胆固醇酯酶酶解后,都转化成游离虾青素。虾青素含量以游离虾青素计。

A.2.2 仪器和用具

- A.2.2.1 分析天平,感量为 0.01mg。
- A.2.2.2 超声波清洗仪。
- A.2.2.3 高效液相色谱仪(附紫外检测器)。
- A.2.2.4 0.45 μ m 微孔滤膜,有机相。
- A.2.2.5 棕色容量瓶,100mL
- A.2.2.6 离心机
- A.2.2.7 涡旋混合器
- A.2.2.8 恒温箱
- A.2.2.9 氮吹仪

A.2.3 试剂和溶液

- A.2.3.1 甲醇,色谱纯。
- A.2.3.2 叔丁基甲醚,色谱纯。
- A.2.3.3 磷酸,优级纯。
- A.2.3.4 三羟甲基氨基甲烷。
- A.2.3.5 石油醚(60-90 $^{\circ}$ C)。
- A.2.3.6 丙酮。
- A.2.3.7 纯水,GB/T 6682 规定的二级水
- A.2.3.8 十水硫酸钠
- A.2.3.9 无水硫酸钠
- A.2.3.10 盐酸
- A.2.3.11 内标:反式- β -阿朴-8'-胡萝卜醛(Trans-beta-apo-8'-carotenal),Sigma 货号 10829 或其他等同品。
- A.2.3.12 对照品:USP Astaxanthin Esters from *Haematococcus pluvialis* RS(注:该对照品是雨生红球藻来源的虾青素酯混合物,含有 13-顺式虾青素、全反式虾青素和 9-顺式虾青素的脂肪酸酯,标示的总虾青素含量以酶解后游离虾青素计约 10%)。
- A.2.3.13 胆固醇酯酶(Cholesterol esterase),Wako Pure Chemicals 货号 037-11221,Sigma 货号 C9281 或其他等同品。

A. 2. 3. 14 0.05mol/L Tris-HCl (PH7.0) 缓冲液的配制: 精确称取三羟甲基氨基甲烷 0.606g, 用 75mL 去离子水溶解, 用 1mol/L 盐酸调 pH7.0, 用水稀释至 100mL。

A. 2. 3. 15 胆固醇酯酶溶液的配制: 精确称取胆固醇酯酶适量到 25mL 容量瓶中, 用 0.05mol/L Tris-HCL (PH7.0) 缓冲液溶解, 配成浓度为 4 个酶活单位/mL 的酶溶液, 现用现配。

A. 2. 4 色谱条件及系统适用性

A. 2. 4. 1 色谱条件

- a) 色谱柱: YMCTM Carotenoid S-5, 4.6mm×250mm 或同类型色谱柱。
b) 流动相: 流动相: A 相: 甲醇; B 相: 甲基叔丁基醚; C 相: 1%磷酸水
梯度条件见表 A1。

表 A1 梯度条件

时间 (min)	甲醇 (%)	甲基叔丁基醚 (%)	1%磷酸水 (%)
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
27.1	81	15	4
35	81	15	4

c) 检测波长: 474nm。

d) 柱温: 25℃

e) 流速: 1.0mL/min

f) 进样量: 20μL

A. 2. 4. 2 系统适用性

系统适用性溶液为对照品溶液。对照品溶液的色谱图与使用的对照品所附的参考谱图相似; 13-顺式虾青素与全反式虾青素的分离度不小于 2.0。

A. 2. 5 操作方法

A. 2. 5. 1 内标溶液的制备: 精确称取约 9mg 内标到 10mL 小烧杯, 用丙酮溶解并转移到 50mL 容量瓶中, 丙酮定容, 摇匀, 即得。

A. 2. 5. 2 对照品储备溶液的制备: 精密称取对照品约 30mg (精确至 0.01mg), 到 10mL 干燥小烧杯中, 用丙酮溶解并转移到 100mL 容量瓶中, 丙酮定容, 摇匀。

A. 2. 5. 3 对照品溶液的制备: 精确吸取 2.0mL 对照品储备液和 1.0mL 内标溶液到 10mL 玻璃具塞离心管中, 再加入 3.0mL 胆固醇酯酶溶液到离心管中, 倒置混合均匀。将离心管置于 37℃ 的恒温箱中反应 45 分钟, 每 10 分钟轻轻地缓慢地倒置混合一次。反应后, 往管中加入 1g 无水硫酸钠, 2mL 石油醚, 涡旋混合 30 秒, 然后置于离心机中在 3000rpm 下离心 3min。新取一只 10mL 玻璃离心管, 加入 1g 无水硫酸钠, 然后用滴管吸取石油醚层, 移入新的管中, 注意不要吸取中间的乳化层。在室温条件下, 用氮气吹干石油醚, 加入 3mL 丙酮, 超声溶解, 过滤, 过滤的溶液即为对照品溶液。

A. 2. 5. 4 供试品储备溶液的制备: 将供试品置于 50-60℃ 水浴中避光保温 30 分钟, 每隔 10 分钟摇一次。精密称取供试品约 60mg (精确至 0.01mg), 到 10mL 干燥小烧杯中, 丙酮溶解并转移到 100mL 容量瓶中, 丙酮定容, 摇匀。可根据供试品的含量适当调节称样量, 如供试品含量为 10%, 则称样量为 30mg。

A. 2. 5. 5 供试品溶液的制备：精确吸取 2.0mL 供试品储备液和 1.0mL 内标溶液到 10mL 玻璃具塞离心管中，再加入 3.0mL 胆固醇酯酶溶液到离心管中，倒置混合均匀。将离心管置于 37℃ 的恒温箱中反应 45 分钟，每 10 分钟轻轻地缓慢地倒置混合一次。反应后，往管中加入 1g 十水硫酸钠，2mL 石油醚，涡旋混合 30 秒，然后置于离心机中在 3000rpm 下离心 3min。新取一只 10mL 玻璃离心管，加入 1g 无水硫酸钠，然后用滴管吸取石油醚层，移入新的管中，注意不要吸取中间的乳化层。在室温条件下，用氮气吹干石油醚，加入 3mL 丙酮，超声溶解，过滤，过滤的溶液即为供试品溶液。

A. 2. 5. 6 测定方法

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液 20 μ L，依次注入高效液相色谱仪，测定，计算含量。

A. 2. 6 结果计算

虾青素油中虾青素含量以游离虾青素的质量分数 w_1 计，数值以%表示，按公式 (A.1) 计算：

$$w_1 = \frac{[1.3A_1(13-cis) + A_1(all-trans) + 1.1A_1(9-cis)] / A_1(I.S.) \times m_1 \times P_1}{[1.3A_2(13-cis) + A_2(all-trans) + 1.1A_2(9-cis)] / A_2(I.S.) \times m_2} \times 100\% \quad \dots\dots (A.1)$$

式中：

w_1 ——供试品中虾青素的含量（以游离虾青素计），%；

m_1 ——对照品的称样量，单位为毫克（mg）；

m_2 ——供试品的称样量，单位为毫克（mg）；

P_1 ——对照品中标识的总虾青素含量（以游离虾青素计），%；

1.3——13-顺式虾青素的相对响应因子；

1.1——9-顺式虾青素的相对响应因子；

$A_1(13-cis)$ ——供试品溶液中 13-顺式虾青素的峰面积；

$A_1(all-trans)$ ——供试品溶液中全反式虾青素的峰面积；

$A_1(9-cis)$ ——供试品溶液中 9-顺式虾青素的峰面积；

$A_1(I.S.)$ ——供试品溶液中内标的峰面积；

$A_2(13-cis)$ ——对照品溶液中 13-顺式虾青素的峰面积；

$A_2(all-trans)$ ——对照品溶液中全反式虾青素的峰面积；

$A_2(9-cis)$ ——对照品溶液中 9-顺式虾青素的峰面积；

$A_2(I.S.)$ ——对照品溶液中内标的峰面积。

注 1：虾青素对光、氧气极为敏感，因此所有操作都应在避光条件下进行。

注 2：虾青素油谱图及各组份出峰顺序参见附录 B 中的 B.2。

A. 3 游离虾青素检测

A. 3. 1 方法提要

非雨生红球藻来源的虾青素如合成虾青素和红酵母发酵生产的虾青素都是游离型的。在液相色谱谱图上，通过对游离的 13-顺式虾青素，全反式虾青素和 9-顺式虾青素峰位的判断和相对峰面积的大小，可以判断是否添加有非雨生红球藻来源的虾青素。

供试品不经酶解，直接进样检测，通过面积归一化法计算总的游离虾青素（13-顺式虾青素和全反式虾青素和 9-顺式虾青素之和）所占总虾青素的比例。

A. 3. 2 仪器和用具

同 A.2.2。

A. 3.3 试剂和溶液

同 A.2.3。

A. 3.4 色谱条件

同 A.2.4。

A. 3.5 操作方法

A. 3.5.1 对照品溶液的制备：同 A.2.5.2 和 A.2.5.3。

A. 3.5.2 供试品溶液的制备：精密称取供试品 30mg（精确至 0.01mg），到 10mL 干燥小烧杯中，用丙酮溶解并转移到 100mL 容量瓶中，丙酮定容，摇匀。

A. 3.5.2 测定方法：分别精密吸取试剂空白丙酮、对照品溶液和供试品溶液 20 μ L，注入高效液相色谱仪，测定。根据对照品溶液谱图中的 13-顺式虾青素，全反式虾青素和 9-顺式虾青素的出峰时间，确定供试品溶液谱图中游离的 13-顺式虾青素，全反式虾青素和 9-顺式虾青素的峰位，并记录这三个峰的峰面积之和与所有峰的总峰面积。

A. 3.6 结果计算

游离虾青素含量以 w_2 计，数值以%表示，按公式（A.2）计算：

$$w_2 = \frac{A_3}{A_4} \times 100\% \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

w_2 ——游离虾青素含量，%；

A_3 ——扣除试剂空白峰后供试品中游离的 13-顺式虾青素，全反式虾青素和 9-顺式虾青素 3 个峰的峰面积之和；

A_4 ——扣除试剂空白峰后供试品中所有峰峰面积之和。

A. 4 水分的测定方法

A. 4.1 设备

A. 4.1.1 自动水分测定仪。

A. 4.1.2 天平，感量为 0.1mg。

A. 4.1.3 微量注射器

A. 4.2 试剂和溶液

A. 4.2.1 无水甲醇

A. 4.2.2 二氯甲烷

A. 4.2.3 卡尔费休滴定液

A. 4.2.4 纯水，GB/T 6682 规定的二级水

A. 4.3 操作方法

A. 4.3.1 溶剂 A 的配制：于密闭棕色瓶中加入 100mL 无水甲醇和 400mL 二氯甲烷，混合均匀，配成甲醇-二氯甲烷=1:4（V/V）的溶液。

A. 4.3.2 卡尔费休滴定液滴定度的测定：加适量的溶剂 A 至滴定杯中，按滴定键滴定至终点。然后用微量注射器精确吸取 10 μ l 纯水，在天平上称量微量注射器的质量，记为 m_2 ，快速注入滴定杯中，再次在天平上称量微量注射器的质量，记为 m_3 。边搅拌边滴定，至终点，记下消耗滴定液的毫升数 V_1 ，计算滴定度 F。重复 3 次，F 取平均值。

A. 4.3.3 空白溶剂 A 的标定：在已滴定到终点的滴定杯中，精确移取 10mL 溶剂 A 至滴定杯中，边

搅拌边滴定，至终点，记下消耗滴定液的毫升数，记为 V_2 。

A. 4. 3. 4 供试品水份的测定：准确称取供试品约 1g（准确至 0.0001g）样品于 10mL 小烧杯中（质量记为 m_4 ），用 6mL 的溶剂 A 溶解，注入滴定杯中，再加入剩余的溶剂 A 4mL 涮洗小烧杯，也注入滴定杯中，边搅拌边滴定。记下消耗的滴定液的毫升数，记为 V_3 。

A. 4. 4 结果计算

卡尔费休滴定液滴定度 F 按式（A.3）计算：

$$F = \frac{V_1}{m_3 - m_4} \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

F —— 卡尔费休滴定液的滴定度；

V_1 ——10 μ l 纯水消耗的卡尔费休滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

m_3 ——注射器加 10 μ l 纯水的质量，单位为克（g）；

m_4 ——10 μ l 纯水注射完，注射器的质量，单位为克（g）

虾青素油中水分的含量以质量分数 w_3 计，数值以%表示，按式（A.4）计算：

$$w_3 = \frac{V_3 - V_2}{m_5 \times F} \times 100\% \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

F —— 卡尔费休滴定液的滴定度；

V_2 ——试剂 A 10mL 消耗的卡尔费休滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试剂 A 10mL 加供试品消耗的卡尔费休滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

m_5 ——供试品质量，单位为克（g）



附录 B

(资料性附录)

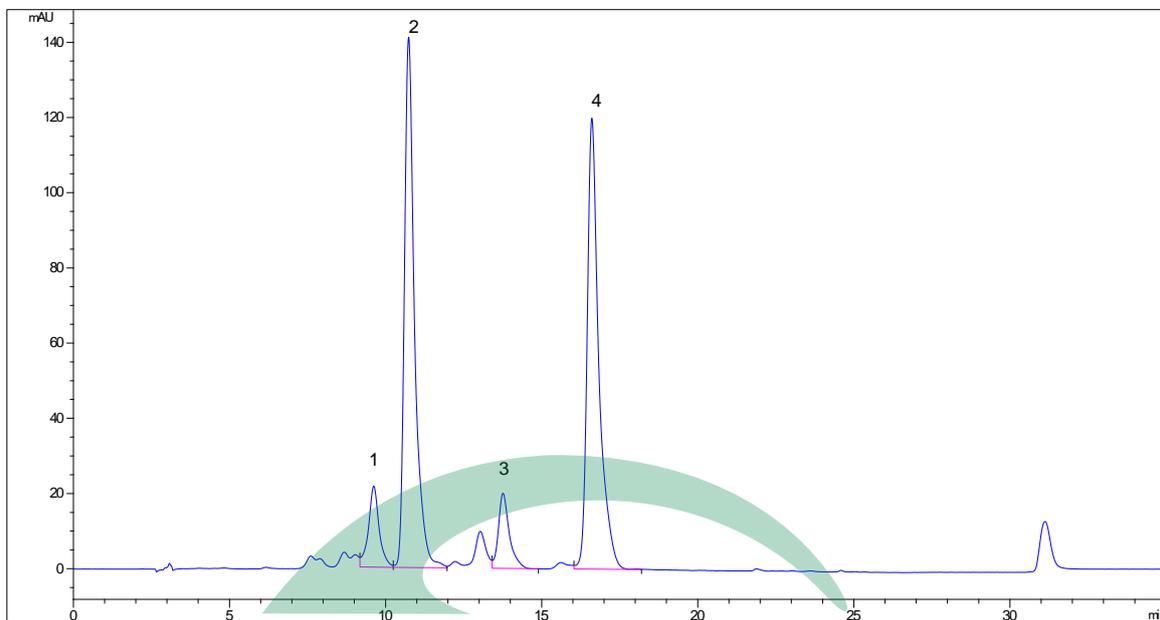
B.1 对照品 (USP Astaxanthin Esters from *Haematococcus pluvialis* RS) 液相色谱图。

图 B.1 对照品液相色谱图

B.2 虾青素油样品液相色谱图。

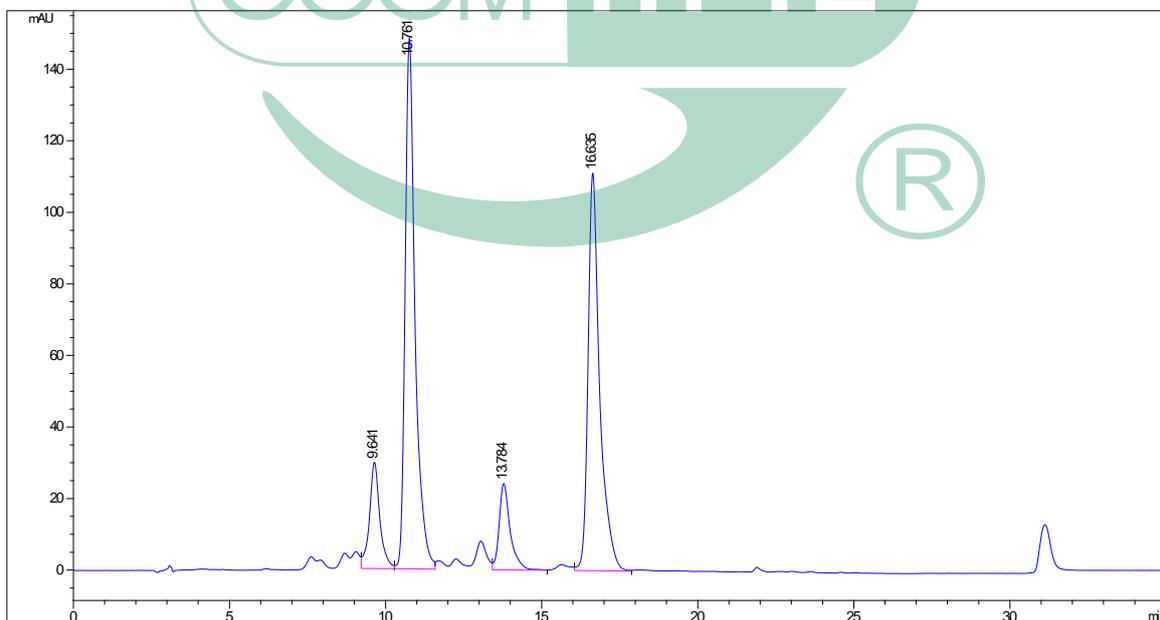


图 B.2 虾青素油样品液相色谱图

B.3 虾青素油样品（未经酶解）液相色谱图

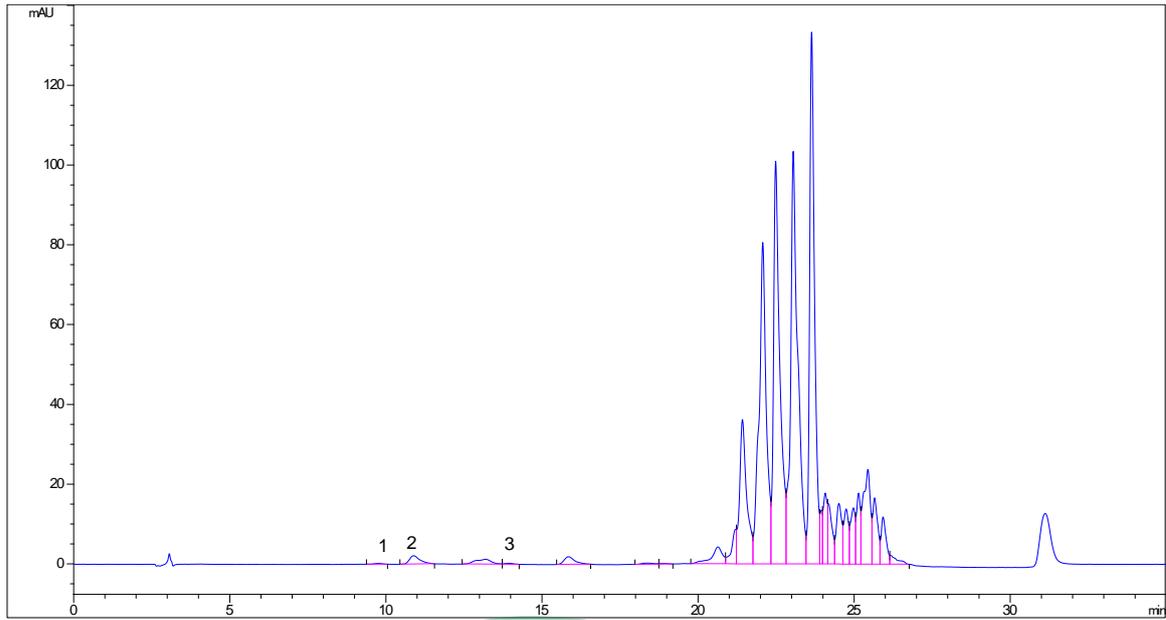


图 B.3 虾青素油样品（未经酶解）液相色谱图

图中组份及出峰顺序见表 B1。

表 B1 虾青素油中各组份参考保留时间

序号	组份名称	保留时间 (min)	相对保留时间
1	13-顺式虾青素	9.641	0.90
2	全反式虾青素	10.761	1.00
3	9-顺式虾青素	13.784	1.28
4	内标	16.635	1.55

非商业性声明：上述所采用的设备、色谱柱、标准对照品等，涉及具体商业品牌、型号的，仅供参考，无商业目的，鼓励标准使用者尝试使用不同品牌、型号的设备、色谱柱及对照品。