

国家市场监督管理总局
保健食品产品技术要求

国食健注G20100683

纽崔莱®多种维生素矿物质咀嚼片

【原料】 维生素C粉（抗坏血酸、玉米淀粉）、富马酸亚铁粉（富马酸亚铁、氢化植物油）、氧化锌粉（氧化锌、单、双甘油脂肪酸酯）、烟酸粉（烟酰胺、单、双甘油脂肪酸酯、二氧化硅）、泛酸粉（D-泛酸钙、氢化植物油）、维生素A粉（棕榈酸视黄酯、明胶、蔗糖、玉米淀粉、维生素E）、维生素E（d-α-琥珀酸生育酚）、维生素D₃粉（胆钙化醇、阿拉伯胶、蔗糖、玉米淀粉、中链甘油三酯、维生素E、二氧化硅）、维生素B₂粉（核黄素、氢化植物油）、维生素B₆粉（盐酸吡哆醇、氢化植物油）、维生素B₁粉（硝酸硫胺素、氢化植物油）、生物素粉（D-生物素、磷酸氢钙）、叶酸粉（叶酸、棕榈油、二氧化硅）、吡啶甲酸铬、维生素B₁₂粉（氰钴胺、磷酸氢钙）

【辅料】 木糖醇粉（木糖醇、羧甲基纤维素钠）、碳酸钙粉（碳酸钙、山梨糖醇、麦芽糊精、二氧化硅）、葡萄糖、麦芽糊精、微晶纤维素粉（微晶纤维素、二氧化硅）、食品用香精（草莓味）、硬脂酸镁、食品用香精（酸橙味）、食品用香精（芒果味）、姜黄素、二氧化硅

【生产工艺】 本品经过筛、混合、压片、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】 聚乙烯塑料瓶应符合GB 4806.7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	橙色，带斑点
滋味、气味	具本品应有的滋味及气味
性状	动物形状片剂
杂质	无肉眼可见的杂质

【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
总砷(以As计)，mg/kg	≤1.0	GB 5009.11
总汞(以Hg计)，mg/kg	≤0.3	GB 5009.17
水分，%	≤5.0	GB 5009.3

灰分，%	≤20	GB 5009.4
铅（以Pb计），mg/kg	≤2.0	GB 5009.12

【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

【功效成分含量测定】 应符合表4的规定。

表4 功效成分含量测定

项 目	指 标	检测方法
维生素A，μg RE/g	200~412	1 维生素A的测定
维生素C，mg/g	26.0~54.0	《中华人民共和国药典》中“维生素C片”项下“含量测定”规定的方法
维生素D，μg/g	3.50~7.20	2 维生素D ₃ 的测定
维生素E，mg/g	2.30~4.21	GB 5009.82
维生素B ₁ ，mg/g	0.24~0.54	GB/T 5009.197
维生素B ₂ ，mg/g	0.26~0.60	GB 5009.85
烟酰胺，mg/g	3.0~6.12	GB/T 5009.197
维生素B ₆ ，mg/g	0.23~0.45	GB/T 5009.197
叶酸，μg/g	70~135	3 叶酸的测定
维生素B ₁₂ ，μg/g	0.40~0.90	4 维生素B ₁₂ 的测定
泛酸，mg/g	1.30~2.40	GB/T 22246
生物素，μg/g	5.30~9.60	5 生物素的测定
铁（以Fe计），mg/g	5.00~6.60	GB 5009.90
锌（以Zn计），mg/g	5.00~6.60	GB 5009.14
铬（以Cr计），μg/g	10.8~16.9	GB 5009.123

1 维生素A的测定

1.1 原理：通过皂化，用HPLC对维生素A进行定量。

1.2 仪器

1.2.1 0.45μm微过滤器。

1.2.2 10mL、100mL移液管，Ca1实验室整取器和容器。

- 1.2.3 125mL锥形烧瓶带塞子。
- 1.2.4 250mL长颈烧瓶带塞子。
- 1.2.5 4L保温瓶。
- 1.2.6 分析天平。
- 1.2.7 自动取样器和Integrator/Data系统。
- 1.2.8 自动取样瓶和盖子。
- 1.2.9 离心分离机。
- 1.2.10 可变移液管。
- 1.2.11 漏斗。
- 1.2.12 玻璃珠子。
- 1.2.13 量筒。
- 1.2.14 高效液相色谱。
- 1.2.15 机械摇动器。
- 1.2.16 样品瓶和旋帽。
- 1.2.17 紫外检测器。
- 1.2.18 容量瓶。
- 1.2.19 吸量管。
- 1.2.20 水浴锅带回流冷凝装置。
- 1.2.21 Waters C18柱子, 10 μ m 4.6 $\times$ 150mm的规格, 或等价的仪器。
- 1.2.22 Whatman 1PS分离滤纸。
- 1.3 试剂
 - 1.3.1 50%氢氧化钾。
 - 1.3.2 冰醋酸: 试剂级。
 - 1.3.3 抗坏血酸。
 - 1.3.4 正己烷: HPLC级。
 - 1.3.5 甲醇: HPLC级。
 - 1.3.6 试剂酒精 (3A)。
 - 1.3.7 USP 维生素A, 醋酸酯胶囊。
 - 1.3.8 维生素A 32-480。
 - 1.3.9 水: HPLC级。
- 1.4 50%氢氧化钾的配制
 - 1.4.1 在置于冰水浴4L的大口瓶中, 一边小心搅拌, 一边把750g的氢氧化钾加入到750mL冷水中。
 - 1.4.2 溶解并冷却至室温。
 - 1.4.3 用橡皮塞密封存储在试剂瓶中。
- 1.5 流动相的配制 (4L)
 - 1.5.1 把2000mL乙腈、1755mL甲醇、220mL水和25mL醋酸混和。
 - 1.5.2 把混合液通过0.45 μ m的滤纸, 滤到4L的保温瓶中, 并除去气体。
- 1.6 储备标准的配制
 - 1.6.1 USP维生素A醋酸酯标准
 - 1.6.1.1 剪开1 USP维生素A胶囊。
 - 1.6.1.2 挤压出约80mg (3滴) 到250mL长颈烧瓶中。
 - 1.6.1.3 继续进行样品配制步骤从1.7.4开始。
- 1.7 维生素样品的制备
 - 1.7.1 称量20片 (参看注解) 并计算平均片重 (ATW)。注: 对于预混物和颗粒, 记录剂量。
 - 1.7.2 把20片碾磨成细粉。注: 碾磨所有的预混物和颗粒。
 - 1.7.3 准确称量大约相当于6000IU的维生素A, 放入250mL长颈烧瓶中。
 - 1.7.4 加入1g 抗坏血酸和2颗沸石。
 - 1.7.5 加入5mL水。
 - 1.7.6 加入25mL试剂级的乙醇。
 - 1.7.7 加入6mL 50%氢氧化钾。
 - 1.7.8 把长颈烧瓶置于沸水浴中, 并加上回流冷凝装置。

- 1.7.9 不断搅拌回流30min，其中前5min是皂化。
- 1.7.10 对于所有的标准和纯的原材料回流20min。
- 1.7.11 把烧瓶移出水浴并在暗处用冰水中冷却约10min。
- 1.7.12 每个烧瓶中加入25mL冰水。
- 1.7.13 加入100mL正己烷。
- 1.7.14 塞上塞子并振荡约10min。
- 1.7.15 静止分层（2层）。
- 1.7.16 用IPS滤纸过滤一部分正己烷层，滤液滤入样品瓶中并加盖。
- 1.7.17 把装有适当标准和样品的小瓶放入自动进样器。
- 注：a. 对于原材料，称量样品重；b. 对于颗粒和预混物，称量研磨后的样品；c. 对于胶囊，打开20个胶囊并混和均匀，称量混和均匀后的样品。

1.8 HPLC操作条件

- 1.8.1 波长：300nm。
- 1.8.2 流速：3.0mL/min。
- 1.8.3 进样体积：20μL。
- 1.8.4 维生素A的近似保留时间=1.2。
- 1.8.5 HPLC的操作条件除波长外，可以改变以优化色谱条件。

1.9 计算

1.9.1 维生素A标准工作液浓度计算

$$C = \text{StdWt} \times P / V \times D.F. \times F$$

式中：

C—维生素A标准工作液浓度，μg RE/mL；

StdWt—称取标准品的重量，mg；

P—标准物质中VA的含量，mg/g；

V—标准储备液定容体积，mL；

D.F. —稀释倍数；

F—维生素A计量单位的转换系数（参考USP的规定）。

1.9.2 样品维生素_A含量计算

$$X = A_{\text{Smp}} \times C / A_{\text{Std}} \times D / S_{\text{mpWt}} \quad \text{式中：}$$

X—维生素A含量，μg RE/g；

A_{Smp}—样品工作液中维生素A色谱峰峰面积；

A_{Std}—标准工作液中维生素A色谱峰峰面积；

S_{mpWt}—称取样品的重量，g；

D—加入萃取液体积，mL。

1.10 转换（参考USP 23 P2138）

维生素转换				
				新标准
维生素A等价物	RE			
		IU	mg	RE
视黄醇		1000	0.30	300
维生素A(棕榈酸酯)		1000	0.55	300
维生素A(醋酸酯)		1000	0.344	300

2 维生素D₃的测定

2.1 范围：本附录规定了用HPLC测定维生素D₃的含量，适用于纽崔莱片剂产品检测。

2.2 方法提要：样品经二甲基亚砷/水混合液消化，正己烷提取后，用高效液相色谱，紫外检测器定量测定。

2.3 仪器

2.3.1 小孔操作TSP HPLC，加热柱、真空除气机。

2.3.2 TSP自动取样器，二极管组图象器或UV2000紫外探测器。

2.3.3 电脑数据读取器/集成系统，色彩查寻器或同类仪器。

- 2.3.4 Keystone Betasil, C18, 250×3.0mm, 5μm, 部件号: 255-701-3。
- 2.3.5 机械搅拌器。
- 2.3.6 离心分离机, 转速约为4000rpm。
- 2.3.7 温控水浴锅。
- 2.3.8 50mL离心分离试管, 20×150mm带塞试管及试管架。
- 2.3.9 200mL容量瓶, 250mL容量瓶, 100mL棕色瓶杯。
- 2.3.10 150mL烧杯。
- 2.3.11 100mL量筒。
- 2.3.12 移液管。
- 2.3.13 一次性移液管。
- 2.3.14 2L锥形瓶。
- 2.3.15 100mL和250mL带塞子的锥形瓶, 10mL配液器(500mL容器)。
- 2.3.16 0.45μm, 13mm注射器式过滤器。
- 2.3.17 取样瓶及螺纹盖。
- 2.3.18 自动取样羡慕及螺纹盖。
- 2.3.19 备件“SPE-ED”SPE盒(500mL)、硅胶(6mL), 部件号: 2106。
- 2.3.20 水流SPE真空管。
- 2.3.21 超声波搅拌器。
- 2.3.22 涡流混合器。
- 2.3.23 压缩空气/氮气。
- 2.3.24 25mL自动滴定管(2000mL容量)。
- 2.3.25 涡流式蒸汽低压干燥器。
- 2.3.26 片剂研磨机。
- 2.4 试剂(HPLC级)
- 2.4.1 水。
- 2.4.2 甲醇。
- 2.4.3 乙腈。
- 2.4.4 二甲亚砜(ACS)。
- 2.4.5 正己烷。
- 2.4.6 乙酸乙酯。
- 2.4.7 二氯甲烷。
- 2.5 流动相配制: TSP4000梯度泵, 倒1L乙腈到A瓶, 2L甲醇到一个分液瓶(B瓶)。
- 2.6 溶剂混合剂
- 2.6.1 二甲基亚砜/水混合液(V/V)(95:5): 用配液器量取190mL二甲基亚砜, 加入10mL水, 混匀。
- 2.6.2 正己烷/乙酸乙酯(V/V)(88:12): 量取88mL正己烷到100mL容量瓶, 加入12mL乙酸乙酯, 混匀, 备用。
- 2.7 标准配制
- 2.7.1 维生素D₃备用标准: 准确称出25mg维生素D₃(USPRS或SRS), 缓慢加到100mL棕色容量瓶中, 用超声波溶解并用甲醇稀释到刻度。
注: 备用标准只可在冰箱中保存10天。
- 2.7.2 维生素D₃使用标准: 吸1mL备用溶液于250mL容量瓶, 混匀并用甲醇稀释至刻度, 浓度约为40IU/mL。
注: 工作标准需现用现配。
- 2.8 试样配制
- 2.8.1 称重不少于20片维生素片, 并测定平均每片重量, 磨成粉末。
- 2.8.2 准确称样到50mL离心管(参看样品称重表)。
- 2.8.3 加10mL 95: 5DMSO/H₂O, 混匀, 塞塞并在60~63℃水浴中加热10min, 试样消化期间或涡流过程中频繁地摇动, 必须混匀。
- 2.8.4 再用机械振动另外混合30min。
- 2.8.5 用自动滴定管加25mL正己烷到管中, 塞上试管塞, 再晃动30min。
- 2.8.6 以4000rpm转速离心试管5~10min。
- 2.8.7 小心地抽取上层透明液体, 取6~12mL加入样本瓶, 以做进一步处理。(运用/不运用SPE程序)

2.8.8 固相萃取

2.8.8.1 调整水滴的滴速在每分钟1~2mL，必要时真空吸出（水滴）。

2.8.8.2 装好固相萃取柱，并将废液收集瓶放于固相萃取设备的针头下面。

2.8.8.3 用2mL正己烷活化柱子，并令其（顺针头）滴出。

2.8.8.4 吸取一定量的样品至固相萃取柱，并观察流出量的速度。

2.8.8.5 用2mL 12%乙酸乙酯的正己烷溶液清洗固相萃取柱，并观察流出量的速度。

2.8.8.6 用不超过8英寸汞柱的限度，抽真空1min，以吸出所有的清洗溶剂达到干燥固相萃取柱的效果。

2.8.8.7 打开固相萃取设备，弃掉样品收集瓶里的所有溶液。

2.8.8.8 换上清洁干燥（20×150mm）的试管置于针头下。

2.8.8.9 用2mL二氯甲烷洗脱，再用相同量洗脱一次，并观察流出量的速度。

2.8.8.10 以不超过8英寸汞柱限度抽真空1min,把固相萃取柱内溶液吸干净，收集所有试管，并置于15psi的氮气下吹干溶剂。

2.8.8.11 量取3mL甲醇至试管中，超声溶解。

2.8.8.12 最后把溶液用直径13mm，孔径0.45μm的过滤器过滤，收集在HPLC的小瓶子内。

2.9 HPLC参数

Gradient 过程：凹面10

时间	A	B	流速
最小值	%乙腈	%甲醇	mL/min
0.0	90	10	0.75
30.0	0	100	0.75
30.2	0	100	1.10
50.0	0	100	1.10
50.2	0	100	0.75
60.0	90	10	0.75
65.0	90	10	0.75

2.9.1 色谱柱：Keston Betasil C18，250×3.0，5μm。

2.9.2 波长：265nm。

2.9.3 进样量：30μL。

2.9.4 保留时间：维生素D₃约15min；维生素D₂约14min；维生素K₁约24min。

2.9.5 运行时间：65min。

2.9.6 色谱柱温度：30℃。

2.10 计算维生素D₃

2.10.1 维生素D₃标准工作液浓度计算

$$C = \text{StdWt} \times P / D_1 \times A / D_2 \times 1000$$

式中：

C—维生素D₃标准工作液浓度，μg/mL；

StdWt—称取标准品的重量，mg；

P—标准品的纯度（100%纯度，P=1）；

A—移取标准储备液定容体积，mL；

D₁—标准储备液定容体积，mL；

D₂—标准工作液定容体积，mL；

1000—mg与μg的转换系数。

2.10.2 维生素D₃含量计算

$$X = \text{Asmp} \times C / (\text{Astd} \times \text{SmpWt})$$

式中：

X—样品中维生素D₃含量，μg/g；

Asmp—样品工作液中维生素D₃色谱峰峰面积；

Astd—标准工作液中维生素D₃色谱峰峰面积；

SmpWt—称取样品的重量，g。

3 叶酸的测定

3.1 原理：本法将被检测的物质溶解在中性溶液中，然后将萃取物注射入高效液相色谱系统中，用反相模式与外部标准进行比较，从而对其中的叶酸进行定量。

3.2 仪器

- 3.2.1 高效液相色谱仪（附紫外检测器）。
- 3.2.2 机械振荡器。
- 3.2.3 离心分离机和35mL的离心试管。
- 3.2.4 超声机。
- 3.2.5 可调节温度的水浴锅。
- 3.2.6 涡流搅拌器。
- 3.2.7 0.45 μ m注射过滤器或直径为11.0cm的玻璃纤维过滤器。
- 3.2.8 样品瓶和瓶盖。
- 3.2.9 自动进样的瓶和瓶盖（有适当的隔片）或HPLC瓶。
- 3.2.10 25mL Brinkmann分液器，和10mL的分配瓶（500mL容量）。
- 3.2.11 标准实验室玻璃器具类。
- 3.2.12 Gelman Solvac的过滤器套件和0.45 μ m薄膜滤器。
- 3.2.13 pH计。
- 3.2.14 片剂磨粉器。

3.3 试剂

- 3.3.1 叶酸标准品（USP或其他第二相关标准品）。
- 3.3.2 磷酸二氢钾KH₂PO₄，ACS级。
- 3.3.3 1.0M四丁基氢氧化铵甲醇溶液，ACS级。
- 3.3.4 二乙烯三胺五乙酸，ACS级。
- 3.3.5 甲醇，HPLC级。
- 3.3.6 乙腈，HPLC级。
- 3.3.7 85%的磷酸，ACS级。
- 3.3.8 氢氧化钠，ACS级。
- 3.3.9 己烷磺酸钠盐，氢氧化物98%。
- 3.3.10 冰醋酸，ACS级。
- 3.3.11 三乙胺，ACS级。
- 3.3.12 HPLC水，Barnstead超纯水。

3.4 试剂准备

- 3.4.1 流动相，2L溶液：称取3.765g己烷磺酸钠盐与1770mL水混和。一边搅拌一边加入20mL冰醋酸、0.5mL三乙胺（pH=2.85 $\pm$ 0.05）、190mL乙腈和20mL甲醇。上述溶液需要用0.45 μ m滤膜过滤，超声混匀并除气泡。
- 3.4.2 1N氢氧化钠：把10g氢氧化钠溶于250mL水中。
- 3.4.3 二乙烯三胺五乙酸：把6g二乙烯三胺五乙酸溶于60mL 1N的氢氧化钠溶液中。
- 3.4.4 萃取溶液，2L溶液：把3g磷酸二氢钾溶于1525mL水中，加入37.5mL 1.0M四丁基氢氧化铵甲醇溶液、60mL二乙烯三胺五乙酸溶液，混和均匀。用85%磷酸调节溶液pH值到7.00 $\pm$ 0.05。最后加入375mL甲醇，混和均匀。

3.5 色谱条件

- 3.5.1 HPLC分析色谱柱，Zorbax SB Phenyl，柱规格250 $\times$ 4.6mm，粒径5 μ m，部件号：880975-912。
- 3.5.2 操作时间：250 $\times$ 4.6mm，5 μ m的柱子，30min。
- 3.5.3 检测波长：280nm。
- 3.5.4 柱温：室温（20 $^{\circ}$ C）。
- 3.5.5 流速：1.5mL/min。
- 3.5.6 进样体积：10 μ L。

3.6 标准溶液的制备

- 3.6.1 储备标准溶液的制备：准确称量叶酸15mg，并放入50mL容量瓶中，溶解并用萃取溶液定容。
- 3.6.2 测试标准溶液的制备：用移液管吸取叶酸储备液1mL，用萃取液稀释并定容到25mL容量瓶中，混和均匀作为一个标准。
- 3.6.3 把上述标准液通过0.45mL注射过滤器，注入HPLC瓶中，待测。

- 3.7 样品的制备：确定20片的平均片中并碾磨成精细粉末，精确称取0.3g样品粉末至离心试管中，从Brinkmann分液器中精确移取25mL 萃取液到离心试管中，盖上盖子，在73 $^{\circ}$ C水浴中加热10min并经常摇动，然

后用机械摇动器摇动30min直至冷却，3000rpm离心3min。把10mL上层清液通过0.45μm的注射过滤器或者玻璃纤维滤纸，注入样品瓶中，吸取一部分放入HPLC瓶中，待测。

3.8 测定：设置好HPLC系统。操作条件按步骤3.5项色谱条件进行设定。数据系统和HPLC初始化，使基线稳定。进样10μL测试标准溶液至HPLC。进样10μL样品溶液至HPLC。

3.9 结果计算

3.9.1 标准工作液浓度计算

$C = \text{StdWt} \times P / D_1 \times A / D_2$ 式中：

C—叶酸标准工作液浓度，mg/mL；

StdWt—称取标准品的重量，mg；

P—标准物质的纯度，%；

A—移取标准储备液定容体积，mL；

D₁—标准储备液定容体积，mL；

D₂—标准工作液定容体积，mL。

3.9.2 样品中待测成分含量计算

$X = \text{Asmp} \times C / \text{Astd} \times D / \text{SmpWt} \times 1000$ 式中：

X—样品中叶酸含量，μg/g；

Asmp—样品工作液中标准色谱峰峰面积；

Astd—标准工作液中待测成分色谱峰峰面积；

SmpWt—称取样品的重量，g；

D—萃取液体积，mL；

1000—mg与μg的转换系数。

4 维生素B₁₂的测定

4.1 目的：利用德氏乳酸杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*, ATCC 7830）测定片剂、原料与预混料中的维生素B₁₂含量。由于德氏乳酸杆菌的生长随着培养基中维生素B₁₂含量升高而呈对数性增加，因此通过使用不含生素B₁₂但具备其他条件的培养基培养该菌种，并以比浊法测定该菌种的生长反应，可测定试样中维生素B₁₂的含量。本方法可以采用手工检测或仪器自动检测进行，以下分别对两种方式进行说明。

手工检测

4.2 试验设备与材料

4.2.1 以穿刺法接种在乳酸杆菌琼脂上的德氏乳酸杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*, ATCC 7830）的冰冻培养物。

4.2.2 35℃水浴。

4.2.3 标准实验室器皿。

注意：所有玻璃器皿必须洁净（以冲刷、漂洗并炉干燥）。仅1升Erlenmeyer瓶使用肥皂清洁。

由于肥皂抑制微生物生长，除1升瓶外的其它Erlenmeyer瓶不能使用肥皂清洁。

4.2.4 醋酸钠。

4.2.5 无水磷酸氢二钠（Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous）。

4.2.6 柠檬酸。

4.2.7 焦亚硫酸钠。

4.2.8 高温高压灭菌器。

4.2.9 氰钴胺参照标准品，按美国药典标准。

4.2.10 一次性20×150mm试管，炉加热6h。

4.2.11 试管架。

4.2.12 去离子水。

4.2.13 Cornwall注射器，设定容积在1.0mL。

4.2.14 10mL血清学吸管。

4.2.15 维生素B₁₂测定培养基。

4.2.16 带螺旋盖的培养基瓶，炉加热6h。

4.2.17 自动移液机，设定容积在5.0mL。

4.2.18 无菌0.85%氯化钠溶液，以125mL三角瓶（Erlenmeyer瓶）盛装。

4.2.19 离心机。

4.2.20 Thermolyne试管混合仪。

4.2.21 带无菌注射器式吸嘴（Combitips）的Eppendorf吸管。

4.2.22 分光光度计，设定在650nm处。

4.2.23 高温高压灭菌器用带。

4.3 操作

4.3.1 接种物的制备：待德氏乳酸杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*，ATCC 7830）的冰冻培养物融解后，将其倒入以125mL三角瓶盛装的无菌0.85%氯化钠溶液中，待接种使用。

4.3.2 接种物的制备

4.3.2.1 将德氏乳酸杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*）的培养物转移至乳酸杆菌发酵液中。

4.3.2.2 在35℃水浴中孵育直至培养基混浊（耗时6~8h）。

4.3.2.3 离心10min。

4.3.2.4 注入发酵液，并以无菌盐水重悬。

4.3.2.5 搅拌并离心10min。

4.3.2.6 重复第4.3.2.4步骤。

4.3.2.7 搅拌并将接种物倒入剩余的盐水中（盛装于125mL烧瓶中）。

4.3.3 标准品的制备

4.3.3.1 称取0.1282g氰钴胺标准品，移入1000mL容量瓶中。

4.3.3.2 以去离子水溶解并定容。

4.3.3.3 取4.3.3.2溶液5mL，以去离子水稀释至1000mL。此即为储备标准溶液。将该溶液标识为B₁₂储备标准溶液，标注浓度5ng/mL，制备日期，有效日期（自制备之日起一个月内有效），制备人姓名以及序号。将该溶液以密封容器在冰箱内贮存。使用当天，可取一等份（大于1.0mL）并先待其逐渐回暖至室温，然后每1.0mL稀释至100mL。此即为工作标准溶液，浓度为0.05ng/mL。上述溶液须每月新鲜制备与取用。

4.3.4 试样的制备

4.3.4.1 取至少20片样品，称重并研磨成精细粉末。对于颗粒状原料与预混料，也须取用相似的量。

4.3.4.2 称取1.4~1.6克试样并移入容量为1L的玻璃三角瓶中。

4.3.4.3 制备磷酸钠缓冲液（每个试样需200mL）：将1.29g无水磷酸氢二钠、1.1g柠檬酸、1.0g焦亚硫酸钠与去离子水混和，以制备100mL缓冲液。

4.3.4.4 将上述物质充分混和溶解。

4.3.4.5 每个试样加入200mL缓冲液。搅拌使试样溶解并均匀混和。在高温高压灭菌器中以15psi处理10min。放凉至室温并以去离子水定容。盖上瓶盖，振荡三角瓶后静置一段时间，令微粒沉降在瓶底。

4.3.4.6 用去离子水稀释25倍。

4.3.5 测定管的制备

4.3.5.1 通过设定为1.0mL的Cornwall注射器（或移液管）将分别向各试管注入去离子水备用。

4.3.5.2 按下表配制标准测定管，一式两份：

试管（ng）	去离子水（mL）	工作标准溶液（mL）
生长对照	5.0	0
0.00	5.0	0
0.050	4.0	1.0
0.100	3.0	2.0
0.125	2.5	2.5
0.150	2.0	3.0
0.175	1.5	3.5
0.200	1.0	4.0
0.250	0.0	5.0

4.3.5.3 制备试样测定管，一式三份，每管含2.0mL去离子水与3.0mL试样溶液。

4.3.5.4 市售粉末状的培养基材料，可用以制备维生素B₁₂测定培养基，只需按其包装标示的方法操作即可制备。使用自动移液机按5.0mL/管的量将该培养基分别移入各试管中。以金属盖封闭各试管口，并贴以灭菌器带，置入高温高压灭菌器中处理。

4.3.6 高温高压灭菌处理、接种、孵育

4.3.6.1 将标准品与试样以15psi进行高温高压灭菌处理5min，缓慢放出蒸汽。将标准与试样放入冷水浴中冷却至室温。

4.3.6.2 按4.3.1制备接种物。

4.3.6.3 使用设定在50μL的Eppendorf吸管将新鲜制备的接种物接种至各个试管中（生长对照管除外）。

4.3.6.4 将试管在35℃水浴中孵育约16h。在进行分光光度计读数前检查各管的浊度。标准溶液试管的浊度应呈现出梯度。

4.4 在分光光度计下读取各管的透射率：将各试管从水浴中移出。在读取浊度前先把各管仔细摇匀。使用生长对照管调零，在650nm处读取空白值（即0.00ng维生素B₁₂），空白管的透射率均应不小于60%。将空白管内容物混和，并使用该悬浊液再次调零。分别读取标准溶液与试样溶液试管的数值并作记录。读数时也需要不时地校正仪器使之归零。

4.5 计算

4.5.1 计算标准溶液试管读数的平均值。计算每份标准溶液读数平均值的对数（log）。

4.5.2 计算三个试样溶液读数的平均值。

4.5.3 使用科学计算器，通过线性回归计算检测结果：

4.5.3.1 按2nd CSR以清除过往储存的数据。

4.5.3.2 以标准浓度为X-轴，以透射率对数为Y-轴（建立坐标），输入各值，绘出一条直线。每个标准浓度的计算，按4.5.3.2.1~4.5.3.2.4进行：

4.5.3.3 输入标准浓度值。

4.5.3.3.1 按 $\boxed{x} \boxed{\frac{\blacksquare}{\blacksquare}} \boxed{y}$ 键。

4.5.3.3.2 输入透射率对数。

4.5.3.3.3 按 $\boxed{\Sigma+}$ 键。

4.5.3.3.4 通过使用2次功能键计算，获得相关系数、斜率与y-截距值。

4.5.3.3.5 获得每个试样在曲线上的值。

4.5.3.3.6 输入试样值的平均值。

4.5.3.3.7 按 $\boxed{\log} \boxed{2nd} \boxed{x^{-1}}$ 键，即得试样在曲线上的值。

4.5.3.4 计算维生素B₁₂的含量（μg）。

4.5.3.4.1 曲线上的值×稀释系数×平均片重×剂量/试样重量。

4.5.3.4.2 稀释系数：1/3×第2次稀释×第3次稀释（如果有的话）（如无2、3次稀释，则稀释系数为1/3）

仪器检测

4.6 试验设备与材料

4.6.1 Autoturb系统，Elanco Products Co. 公司产品。

4.6.2 Autoturb稀释仪（Dilutor）。

4.6.3 Autoturb阅读器（Reader）。

4.6.4 Autoturb水浴。

4.6.5 Autoturb稀释仪架（Dilutor Racks）。

4.6.6 Autoturb转盘（Turntable Tray）。

4.6.7 离心机。

4.6.8 Varian分光光度计，设定在650nm。

4.6.9 小试管（cuvette），Fisher Brand Acrylic，一次性用品，波行路长1cm。

4.6.10 振荡试管混合仪。

4.6.11 细菌焚化炉，Scientific Products或同类产品。

4.6.12 低温贮存容器。

4.6.13 低温无菌试管。

4.6.14 16×100mm培养管。

4.6.15 18×150mm培养管。

4.6.16 标准实验室玻璃器皿。

注意：所有玻璃器皿必须经仔细清洁。未经彻底冲刷、漂洗并经实验室炉300°F干燥的实验室器皿可对试验用微生物产生抑制作用。

4.6.17 1L三角瓶（Erlenmeyer瓶）。

4.6.18 装有DRI-RITE（无水氯化钙）的干燥器。

4.6.19 无菌0.85%氯化钠溶液，以100mL三角瓶（Erlenmeyer瓶）盛装。

4.6.20 滤纸，Whatman，Glass Microfibre，12.5cm，GF/A。

4.6.21 长柄漏斗。

4.6.22 试管，20×150mm，带螺旋盖与试管架。

4.6.23 维生素B₁₂测定培养基，Difco 0457-15-1或同类产品。根据生产商指引制备半强度培养基。替代制

备方法可参看AOAC第13版。该培养基不能过度受热，须放凉至室温时使用。

4.6.24 试管摇床。

4.6.25 去离子水。

4.6.26 氰钴胺参照标准品，美国药典标准。

4.6.27 德氏乳酸杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*, ATCC 7830）。

4.6.28 无水磷酸氢二钠（Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous, Na₂HPO₄），试剂级。

4.6.29 单水柠檬酸，试剂级。

4.6.30 焦亚硫酸钠（Na₂S₂O₅），试剂级。

4.7 操作

4.7.1 接种物的制备：待德氏乳酸杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*, ATCC 7830）的冰冻培养物融解后，将其倒入以100mL三角瓶盛装的无菌0.85%氯化钠溶液中，待接种使用。

4.7.2 标准溶液的制备

4.7.2.1 称取0.1282克氰钴胺参照标准品，移入1000mL容量瓶中。

4.7.2.2 以去离子水溶解并定容。

4.7.2.3 取4.7.2.2溶液5mL，以去离子水稀释至1000mL。此即为储备标准溶液。

4.7.2.4 将该溶液标识为B₁₂储备标准溶液，标注浓度5ng/mL，制备日期，有效日期（自制备之日起一个月有效），制备人姓名以及序号。将该溶液以密封容器在冰箱内贮存。使用当天，可取一等份（约60mL）并先待其逐渐回暖至室温。该标准溶液须每月新鲜制备与取用。

4.7.2.5 按下表量吸取储备标准溶液（浓度5ng/mL）并稀释，获得工作标准溶液0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0ng/mL。

4.7.2.6 以去离子水稀释定容。

4.7.3 试样的制备

4.7.3.1 取至少20片，称重并研磨成精细粉末。

4.7.3.2 称取0.8~0.9g试样并移入容量为1L的Erlenmeyer瓶中。

4.7.3.3 制备磷酸钠缓冲液（每个试样需200mL）：将1.29g无水磷酸氢二钠、1.1g柠檬酸、1.0g焦亚硫酸钠与去离子水混和，以制备100mL缓冲液。将上述物质充分混和溶解。

4.7.3.4 试样的稀释：每个试样加入200mL缓冲液。搅拌使试样溶解并均匀混和。在高温高压灭菌器中以15psi处理10min。放凉至室温并以去离子水定容。盖上瓶盖，振荡三角瓶后静置一段时间，令微粒沉降在瓶底。将16×100mm培养管放置在试样架上。培养管按未接种对照管、空白培养基管、标准管、样品管的顺序排列、在测试的最后有必要放置标准曲线的第一点和最后一点，记录各管的摆放位置。按仪器设定的稀释倍数在稀释架放置对应数量的18×150mm培养管。在每次运行结束时，应已获得标准曲线的起点与终点。试样转盘上的每一试管，均加入50mL半强度维生素B₁₂测定培养基与额外的50mL培养基以冲洗Autoturb稀释仪。在启动Autoturb稀释仪前，查看废液瓶是否剩余有足够空间。随后开启真空与气压阀。

4.7.3.4.1 按下Autoturb II稀释仪键盘上的MODE键，直到看到仪器显示WASH循环为止。

4.7.3.4.2 按下START键，启动该操作。按“5”个清洗循环，然后按ENTER。

4.7.3.4.3 将探针与入口管置入去离子水中（以量杯盛装），按START键。

4.7.3.4.4 完成清洗循环后，按MODE键，待仪器显示ALTERNATE模式。按START键启动之。

4.7.3.4.5 按“2”与ENTER键进入冲洗循环。将两条充填入口线（filler inlet lines）置入半强度维生素B₁₂测定培养基中（以量杯盛装），按START键。

4.7.3.4.6 输入在试样架上的试样数量，按ENTER键。

4.7.3.4.7 更换试样臂的探针，所有试样架就位，按START键。

当稀释操作完成后，进样环（loop）体积为0.1mL时，标准曲线水平分别为0.02、0.03、0.04、0.06、0.08及0.10μg每管；进样环体积为0.15mL时，标准曲线水平分别为0.03、0.045、0.06、0.09、0.12及0.15μg每管。各管稀释完毕后，立即加盖封闭并在121℃、15psi下灭菌处理5min，然后缓慢排气。不可过度加热。在水浴中冷却至室温。

4.7.3.4.8 按4.7.1制备接种物。

4.7.3.4.9 将Eppendorf吸管设定在150μL（将转盘旋至3），然后用以将新鲜制备的接种物接种在各试管中（未接种对照管、空白培养基管及末两管除外）。

4.7.3.5 将各管在35℃水浴中孵育约16h。在进行分光光度计读数前检查各管的浊度。标准溶液试管的浊度应体现出梯度。

4.8 Autoturb读数模块（Reader Module）的启动：孵育16h后，检查无接种对照管。如无接种对照管出现

菌种生长，本次测定试验无效。如无接种对照管正常，按下列程序继续操作。将各架浸入温度不低于80℃的水浴中加热5min，终止各管生长。

4.8.1 查看废液瓶是否剩余有足够空间。

4.8.2 开启真空与气压阀。

4.8.3 按下Autoturb II阅读器键盘上的MODE键，直到看到仪器显示WASH循环为止。

4.8.4 在WASH循环下按“20”及ENTER键。将探针置入以量杯盛装的去离子水中，按START键。

4.8.5 当WASH循环完毕后，按MODE键，选MANUAL模式并按START键启动之。PROBE VAC键也将被激发。按此键一次即可启动，再次按下该键即停止。

4.8.6 容纳试验各管的测定稀释架冷却后，使用摇床摇匀各试管。取无接种对照管并将两管在流动小室（flow cell）中冲洗，以调“零”及“100% T”。将探针置入此两管中之一，持续按下分光光度计的“zero”键调零直至数字电压表（digital voltmeter, DVM）上显示 0.000 ± 0.002 读数为止，松开“zero”键。粗调分光光度计的“100% T”直至数字电压表（DVM）上显示100.0% T读数为止。

4.8.7 按MODE键，进入NORMAL模式，并按START启动。输入测定日期，按ENTER键。再次按ENTER键，获得测定识别码。

4.8.8 输入本次测定的试管数量并按ENTER键。

4.8.9 要“transmit data”，按“0”。

4.8.10 安放好稀释架，按START键。

4.8.11 打印机将打印表单，予每个试管分派一个号码用以识别，同时相应记录各管透射率（% T）。

4.8.12 按下列程序将上述表单的数据输入Autoturb程序：

4.8.12.1 由上至下分析表单的所有数据。第一组四个数字表示无接种对照。第二组四个数字表示已接种的生长对照。第三组开始直至最后的数据即为本测定中各试样在标准曲线上的对应点。

4.8.12.2 在电脑上点击AUTB图样，启动Autoturb分析。分析识别码（ID）是测定日期+B₁₂（如3-29-96B₁₂）。应直接使用该识别码。分析项目为“Vitamin B₁₂”。方法名称为“BQL-701”。如标准曲线完备，可点击Control Enter按钮。

注：方法比例因子（Method scale factor）=（1.000表示第一次稀释容积为1000mL）

4.8.12.3 转盘（Carousel）—参看试样架上的各试管

1. U 1 - 试样名 = “Sterility with Standard.”（“标准品，无菌”）

2. B 0 - 代表已接种的生长对照

3. C 1 - 标准曲线上的第一点应为0.2ng/mL

↓ ↓

8. C 6 - 标准曲线上的最后一点应为1.0ng/mL

9. S 1 - 试样名 = 试验者据实输入

试样重量 = 称量入1000mL瓶中的样品量（克）

稀释系数 = 第二次稀释比例的倒数（例如，第二次稀释为15/100mL，即稀释系数为100/15=6.667。如无第二次稀释，该稀释系数为1）。

每次服用量 = 平均片重 × 片数

10. S 2 - 试样名 = 输入实验室号（LIMS），等等。

输入所有试样数据后，点击Control Enter按钮。

4.8.12.4 从键盘上向Autoturb输入数据。

4.8.12.4.1 0 → 1000 MV = 0 → 100% T。

4.8.12.4.2 小数点可忽略。

4.8.12.4.3 从第一组四个数字（即无接种对照）开始，输入表单上的透射率（% T）数据。

4.8.12.4.4 输入所有数据后，点击Control Enter按钮。

4.8.12.4.5 退出程序，选择适当的打印机。

4.8.12.4.6 进入Autoturb系统，生成Autoturb分析报告。（通过日期与姓名调出数据）

4.9 计算

通过下列程序，可进行手工计算：

计算进样环容积分别在0.10及0.15mL时每个标准品与样品平行样读数的平均值。使用一阶半对数纸、以平均反应（透射率，% T）的对数与标准曲线浓度为坐标，绘出剂量-反应曲线。分别给出0.10及0.15mL进样环容积的标准曲线。从这些曲线上，确定不同进样环容积下试样的浓度。分别算得此两条曲线上得到的结果，计算其平均值。

试样中氰钴胺浓度 (ng/g) = 自曲线所得平均浓度 (ng/mL) × 1000 mL × D / (试样重量 (g) × A)

式中：D—第二次稀释容积；

A—第二次稀释的等份量。

氰钴胺浓度 (μg/每次服用量) = 试样中氰钴胺浓度 (ng/g) × 每次服用重量 (g) × 1/1000 ng/μg

4.10 维护：Autoturb稀释仪单元须每周清洁一次。每次清洁时，应以3%过氧化氢溶液冲洗至少10次。

5 生物素的测定

5.1 目标：用乳酸杆菌plantarum ATCC 8014测定营养片、原材料及预混料中的生物素的含量。使用除生物素外所有营养都很全面的基础培养基培养微生物，微生物的生长反应应用浊度计测定。实验微生物随着生物素数量的增加呈现对数增长规律。

手工检测

5.2 设备和材料

5.2.1 生长在乳酸菌琼脂刺上的乳酸杆菌plantarum培养体ATCC 8014。

5.2.2 15mL离心分离试管，装有10mL乳酸菌接种体肉汤。

5.2.3 35℃水浴。

5.2.4 标准实验室玻璃器皿。

注：所有玻璃器皿都必须仔细清洗干净（洗涤、漂洗、烘箱干燥）。

5.2.5 氢氧化铵缓冲溶液（104.8g NH₄OH，ACS级，用14,895mL去离子水稀释，存放在Nalgene细口玻璃瓶中，贮存于室温下）。

5.2.6 高压灭菌器。

5.2.7 取自Sigma的生物素标准样。

5.2.8 已在烤箱中加热6h的20×150mm试管。

5.2.9 试管架。

5.2.10 去离子水。

5.2.11 Cornwall注射器，设定为1.0mL。

5.2.12 10mL血清吸量管。

5.2.13 生物素分析培养基。

5.2.14 已在烤箱中加热6h的带螺帽的培养基瓶。

5.2.15 设定为5.0mL的自动吸量器。

5.2.16 125mL锥形瓶，装有0.85%无菌盐溶液。

5.2.17 离心分离机。

5.2.18 Thermolyne试管混合器。

5.2.19 Eppendorf吸量管。

5.2.20 设定为650nm的分光光度计。

5.2.21 高压灭菌带。

5.3 实验步骤

5.3.1 接种体制备。

5.3.1.1 将乳酸杆菌plantarum的培养基移入乳酸菌肉汤。

5.3.1.2 将肉汤放在35℃水浴中孵化，直至介质变得混浊（需6~8h）。

5.3.1.3 离心分离10min。

5.3.1.4 滗掉肉汤，加入无菌盐溶液，使用下层物质重新悬浮。

5.3.1.5 涡流搅拌，离心分离10min。

5.3.1.6 重复步骤5.3.1.4。

5.3.1.7 涡流搅拌，将溶液倒入125mL烧瓶中的盐溶液中。

5.3.2 标准样制备

5.3.2.1 称取0.200g d-维生素H参比标准样，移入200mL容量瓶。加入50mL 0.12N NH₄OH缓冲溶液（参看2.5）。

5.3.2.1 用去离子水溶解标准样并稀释至满刻度。

5.3.2.2 用去离子水将1mL上述溶液稀释至100mL。

5.3.2.3 用去离子水将1mL上述溶液稀释至100mL。

5.3.2.4 在标签上注明：生物素贮存标准样；0.1μg/mL；制备日期；失效日期（制备日期起1月内有效）；制备者名字首字母；参比号码等内容。塞紧瓶口，贮存在冰箱内。使用时取一部分（多于1.0m

L)，升温至室温，用去离子水将1.0mL稀释到500mL，制备成实验标准样，浓度为0.2ng/mL。每个月制备新标准样。

5.3.3 试样制备

5.3.3.1 称取20片维生素片，研成细粉。若原料或预混料呈细小颗粒状，也取相似数量，研成细粉。

5.3.3.2 称取1.0~1.2g的试样，移入1L玻璃容量瓶。

5.3.3.3 向每个试样中加100mL 0.12N氢氧化铵缓冲溶液，振荡，使试样溶解或均匀分散。在15psi高压灭菌器中灭菌5min，冷却至室温后用去离子水稀释满刻度。盖上瓶盖，用力振荡，留一段时间，让小微粒沉着在烧瓶底部。

5.3.3.4 用去离子水稀释50倍。

5.3.4 分析试管制备

5.3.4.1 用注射器向每一个试管分配1.0mL去离子水。

5.3.4.2 按照以下数据制备双份标准样化验试管。

试管	去离子水	实验标准样
生长控制样	5.0mL	0mL
0.00	5.0mL	0mL
0.20ng	4.0mL	1.0mL
0.40ng	3.0mL	2.0mL
0.60ng	2.0mL	3.0mL
0.80ng	1.0mL	4.0mL
1.00ng	0mL	5.0mL

5.3.4.3 制备三份含有2.0mL去离子水、3.0mL试样溶液的试样试管。

5.3.4.4 用购买的粉状材料制备生物素分析培养基，按包装上的说明操作。用自动吸量器量取培养基，向每个试管内加入5.0mL。盖好金属盖，用灭菌带给试管做标签，放入高压灭菌锅灭菌。

5.3.5 高压灭菌、接种及孵化

5.3.5.1 将标准样和试样放在15psi的高压灭菌器内灭菌5min（慢慢排放灭菌器内的气体），然后在冷水浴里冷却至室温。

5.3.5.2 按照5.3.1制备接种体。

5.3.5.3 用Eppendorf吸量管量取50μL新制备的接种体，给每一个试管内的物质接种（生长控制样不接种）。

5.3.5.4 在35℃水浴里孵化约16h。读数前先检查标准样试管的浊度，标准样试管的浊度会分等级。

5.4 读取分光光度计上的透射率百分比数

从水浴中取出试管，读取浊度前要将每个试管完全涡流搅拌。用生长控制样调零。读取650nm分析空白（0.00ng d-维生素H），分析空白不少于60%。汇集所有的分析空白，用以重新调零，在读数时要不断将仪器调零。读取标准样和试样的透射率，记录读数结果。

5.5 计算

5.5.1 算出标准样试管的平均读数，找出每个标准样平均读数的对数值。

5.5.2 算出三个试样的平均读数。

5.5.3 根据线性回归，用高级科学计算器计算结果。

5.5.3.1 清除以前存贮的数据，按 $\boxed{2\text{nd CSR}}$ 。

5.5.3.2 根据X轴（标准样浓度）和Y轴（透射率对数）上的输入值确定一条直线，计算方法如下：

1) 输入标准浓度值。

2) 按 $\boxed{x \rightarrow y}$ 。

3) 输入透射率对数值。

4) 按 $\boxed{\Sigma+}$ 。

5.5.3.3 用2次功能键计算，得到两个数值的相关性、斜率以及Y轴截距。

5.5.3.4 得到每个试样的图表值。

1) 输入试样平均值。

2) 按 $\boxed{\log 2\text{nd } x^1}$ ，得到图表值。

5.5.3.5 计算维生素H的数量（μg）。

1) 图表值 × 稀释系数 × ATW × NT / SW。

2) 稀释系数 = $1/3 \times \text{二次稀释} \times \text{三次稀释}$ （如果有）

仪器自动检测

5.6 仪器和材料

5.6.1 Autoturb II 系统, Mitchum - Schaefer, 包括:

Autoturb II 稀释器

Autoturb II 读取器

Autoturb 水浴锅

Autoturb 稀释器架

5.6.2 离心机。

5.6.3 Varian公司的分光光度计, 设置波长为650nm。

5.6.4 小玻璃管, Fisher Brand Acrylic, 可使用长度为1cm。

5.6.5 涡流管混合器。

5.6.6 细菌焚烧炉, 科学产品或等同产品。

5.6.7 16×100mm Culture管子。

5.6.8 18×150mm Culture管子。

5.6.9 标准实验室玻璃器具

注: 所有玻璃器具必须严格清洁。凡是没有通过彻底清洗、冲洗和在300° F下烘干, 都会对有机体实验产生抑制作用。

5.6.10 1L的锥形瓶。

5.6.11 干燥器带DRI-RITE。

5.6.12 装于100mL锥形瓶中的经过消毒的0.85%盐水。

5.6.13 滤纸 (Whatman); 玻璃微纤维, 12.5cm, GF/A。

5.6.14 长颈漏斗。

5.6.15 20×150mm, 测试管 (配旋帽和架子)

5.6.16 生物素分析培养皿, 差分计数器0419-15-8或等同的仪器设备。根据厂商的说明准备一半的长度。在AOAC的第13版可以找到一个可替换的预处理方法。不要经过加热——允许培养皿降至室温。

5.6.17 曲锉。

5.6.18 双蒸水。

5.6.19 Sigma公司的d-生物素标准品。

5.6.20 琼脂针刺培养的乳酸杆菌, ATCC 8014。

5.6.21 放置在15mL离心试管中的10mL乳酸菌接种体。

5.6.22 氢氧化铵的缓冲溶液 (104.8 NH₄OH, A. C. S. 在14.895mL 双蒸水中, 室温下储存于Nalgene公司的用藤罩保护的大玻璃瓶中)。

5.6.23 磷酸一氢钠 (Na₂HPO₄), 试剂级。

5.6.24 柠檬酸一水合物, 试剂级。

5.6.25 无水焦亚硫酸钠 (Na₂S₂O₅), 试剂级。

5.7 程序

5.7.1 接种体的准备 (参考过程No. 745)

5.7.1.1 把培养基中的乳酸杆菌转至乳酸菌肉汤中。

5.7.1.2 35°C水浴孵化直至介质变混浊 (6~8h)。

5.7.1.3 离心10min。

5.7.1.4 倒出肉汤, 并用消毒盐水使颗粒状物再次悬浮。

5.7.1.5 涡流并离心10min。

5.7.1.6 重复第5.7.1.4步。

5.7.1.7 涡流并倒入本身有盐水的125mL锥形瓶中。

5.7.2 标准的配备

5.7.2.1 称取0.200gd-生物素参考标准物并移至200mL容量瓶中。加入50mL 0.15N的NH₄OH缓冲溶液 (参考步骤I. X.)。

5.7.2.2 溶解标准品并用二次蒸馏水稀释到刻度。

5.7.2.3 取1mL上述溶液, 并用二次蒸馏水稀释到100mL。

5.7.2.4 取2.2.3中的溶液10mL, 并用二次蒸馏水稀释到1000mL

5.7.2.5 贴上生物素标准储备液, 0.1mcg/mL的标签, 并在标签上表明: 配制时间、有效期限 (配制后的一个月内)、配制者名字的首个字母以及参考序号。用塞子塞紧, 放置于冰箱中。使用当天取出部分 (大

约60mL)，暖至室温。每个月需要配制新的标准。

5.7.2.6 配制操作标准，按照以下的浓度制备标准储备液(0.1mcg/mL)：0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0ng/mL。

5.7.2.7 用二次蒸馏水稀释到相应的体积。

5.7.3 样品的配备

5.7.3.1 称量并研磨至少20片样品至精细粉末。

5.7.3.2 称量0.5~0.6克样品，并移至1L的容量瓶中。

5.7.3.3 每个样品中加入100mL 0.12N 氢氧化铵缓冲溶液。打漩直至溶解或均匀散布。15psi高压灭菌5min。冷却至室温并用双蒸水稀释到刻度。盖紧瓶盖并振荡。放置一段时间使颗粒沉淀至瓶底。

注：200mL磷酸一氢钠缓冲溶液可用来取代100mL 0.12N氢氧化铵缓冲溶液，两者二选一。

5.7.3.3.1 配制磷酸一氢钠缓冲溶液（200mL每个样品）：

5.7.3.3.2 1.29g磷酸一氢钠+1.1g柠檬酸+1.0g焦亚硫酸钠+双蒸水，混和成100mL缓冲溶液。

5.7.3.3.3 充分溶解。

5.7.3.3.4 每个样加入200mL缓冲溶液。打漩直至溶解或均匀散布。15psi高压灭菌10min。冷却至室温并用双蒸水稀释到刻度。盖紧瓶盖并振荡。放置一段时间使颗粒沉淀至瓶底。

5.7.3.4 16×100mm培养管放置在试样架上。培养管按未接种对照管、空白培养基管、标准管、样品管的顺序排列、在测试的最后有必要放置标准曲线的第一点和最后一点，记录各管的摆放位置。按稀释数量放置18×150mm培养管在两个稀释架上。对于每个在转盘中的样品管，装入50mL半浓度的生物素分析介质，加上额外的50mL用于冲洗Autoturb稀释器。在开启Autoturb稀释器前，检查废液瓶并看是否有足够的空间。打开真空系统和空气施压阀。

5.8 测定

5.8.1 在Autoturb II稀释器的键盘上，按下“MODE”键直至活的 WASH循环。

5.8.2 按“STAR”键使其启动。按“5”清洗循环并按“ENTER”。

5.8.3 放置探测器，并把样品管插入装有双蒸水的大口瓶中，按下“STAR”键。

5.8.4 完成后，按下“MODE”键直至获得“ALTERNATE”模式并按下“STAR”键使其启动。

5.8.5 对于冲洗循环按“2”键并按“ENTER”确认。把2条填满的样品的样品架放入半浓度的生物素分析中介大口瓶中，按下START键。

5.8.6 输入样品架上测试样品的号码并按下“ENTER”。

5.8.7 把探测器取出，并把所有样品架就位，按下“STAR”键。

一旦稀释流程完成，标准曲线的范围是0.05、0.1、0.2、0.3、0.4和0.6mcg每个样品管对于0.1mL循环；而对于0.15mL的循环，标准曲线的范围则是0.075、0.15、0.3、0.45、0.6和0.9mcg每个样品管。在样品管被稀释以后，立刻加盖并在121℃下消毒5min，在15psi下，慢慢排气。不要过热。在水浴中冷却至室温。

5.8.8 根据步5.7.1准备接种体。

5.8.9 用Eppendorf的移液器，设置在150μL（刻度盘应该设置在3）处，用刚准备的接种体接种每一个测试样（未接种对照管、空白培养基管及末两管除外）。

5.8.10 在35℃下水浴孵化16h。在读数前确认样品管是混浊的。对于标准样品，混浊度应该存在一个梯度。

5.9 启动Autoturb读取模块。

16个小时孵化以后，检测未被接种的对照品。如果有增长，这次测试将视为无效。如果没有接种的样品管是空白的，那么按以下步骤继续。通过把所有的样品架浸入到不低于80℃的水浴中5min，终止生长。

5.9.1 检查废液瓶是否有足够的空间用以装废弃的溶液。

5.9.2 打开真空和空气压力阀门。

5.9.3 在Autoturb II读取器键盘上按“MODE”键直至获得“WASH”循环为止。

5.9.4 在冲洗循环的状态下输入“20”。把探测器放入装有双蒸水的大口瓶中并按“START”键。

5.9.5 当冲洗循环完成后，按下“MODE”键转换到“MANUAL”模式，并按下“START”键启动。这将启动“PROBE VAC”键。一旦开始，按下它。再次按下“PROBE VAC”键可以停止。

5.9.6 一旦测试样品冷却，拿出曲锉并混和试管。把没有孵化用于参比的样品和满盈的两个样品通过流动槽，分别设置“0”和“100%T”。把探测器放进参比样品中，按下分光光度计的“0”键并一直按着，调零，直至数字伏特计（DVM）读数偏差为±0.002。然后松开“0”键。粗略的调校分光光度计“100%T”直至DVM的读数为100.0%T。

5.9.7 按下“MODE”键至“NORMAL”模式，并按“START”启动。输入分析数据并按“ENTER”。再次按下“ENTER”确认数字。

5.9.8 输入代测样品的编号，按下“ENTER”。

5.9.9 对于“传输数据”，按“0”。

5.9.10 放置样品架并按“START”键。

5.9.11 打印机将产生确认每个样品相应的“%T”的磁带。

5.9.12 把磁带上的数据输入到电脑的Autoturb程序中，按以下步骤操作：

5.9.12.1 把输出的磁带从头到尾进行分析。第一个系列的4个号码是代表没有孵化的无菌状态。第二个系列的4个号码代表孵化生长参比。第三个系列的4个样品直至最后是代表测试标准曲线的取点样品。

5.9.12.2 点击“AUTB”图标并设置Autoturb分析。分析ID是正在操作的分析数据，BN为后缀。请仅用编号（如3-29-96 BN）。分析描述为“生物素分析”。方法名称为“BQL-703”。如果认可标准曲线，点击“CONTROL ENTER”。

注：方法的比例因子 = (1.000相应于第一次稀释为1000mL)

5.9.12.3 Carousel - 相应于样品检验员的测试样品架

1. U 1 - 样品名称是 = “无菌标准”。

2. B 0 - 代表孵化生长参比。

3. C 1 - 标准曲线的第一点应为0.5ng/mL。

↓ ↓

8. C 6 - 标准曲线的最后一点应为6.0ng/mL。

9. S 1 - 样品名称 = 自己控制。

样品重量 = 1000mL容量瓶中样品的总重量。

稀释因子 = 二次稀释的转换（也就是如果二次稀释为15/100mL，那么它是100/15=6.667；如果没有第二次稀释，那么就为1）。

样品操作大小 = ATW × NT。

10. S 2 - 样品名称 = LIMS 号码等。

输入所有样品后，点击CONTROL ENTER。

5.9.12.4 用键盘输入Autoturb数据。

5.9.12.4.1 0 → 1000mv = 0 → 100% T。

5.9.12.4.2 忽略小数点。

5.9.12.4.3 从第一个系列的4个号码=未孵化的参比，开始在磁带上输入%T数值

5.9.12.4.4 所有数值输入后，点击“CONTROL ENTER”。

5.9.12.4.5 退出程序并转换打印机到合适的打印机上。

5.9.12.4.6 重新回到Autoturb系统并声称Autoturb分析报告。（用数据和词首大写字母去恢复数据）。

5.10 计算

可以按照下面的说明进行手工计算：

每个标准和样品对于0.10mL和0.15mL的循环，把读数的副本平均。通过把平均响应值（%T）取对数，相应于浓度在半对数的坐标图纸绘出剂量响应曲线，一个循环一张纸。每两个循环描绘一张标准曲线。从曲线中确定每个循环的样品的浓度。把从两个图中得到的结果平均。

生物素（ng/g）=自曲线所得平均浓度（ng/mL）×1000mL×D/（试样重量（g）×A）

式中：

D—第二次稀释体积；

A—第二次稀释的等份量。

5.11 维护：每周一次清洁Autoturb稀释器单元，用3%过氧化氢水溶液至少冲洗10次。

【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”项下片剂的规定。

【原辅料质量要求】

1. 维生素C粉（抗坏血酸、玉米淀粉）

项 目	指 标
来源	L-抗坏血酸、玉米淀粉

制法	抗坏血酸原料经粉碎后，加入玉米淀粉制成的粘合剂进行制粒，干燥、包装及入库
感官要求	白色至淡黄色粉末
维生素C，%	96.00~98.00
水分，%	≤0.3
灼烧残留，%	≤0.10
重金属，mg/kg	≤10
砷，mg/kg	≤3.0

2. 富马酸亚铁粉（富马酸亚铁、氢化植物油）

项 目	指 标
来源	富马酸亚铁、氢化植物油
制法	富马酸亚铁，氢化植物油原料检验合格后，进入流化床微胶囊处理，过20目筛，包装。
感官要求	紫棕色颗粒
富马酸亚铁，%	58.0~63.0
铁，%	19.00~20.70
铅，ppm	≤10.00
砷，mg/kg	≤4.0
干燥失重，%	≤1.5
硫酸盐，%	≤0.2
高铁盐，%	≤2.0

3. 氧化锌粉（氧化锌、单、双甘油脂肪酸酯）

项 目	指 标
来源	氧化锌、单、双甘油脂肪酸酯
制法	氧化锌与单-双甘油脂肪酸酯原料混合，进行微胶囊化后包装。
感官要求	白色粉状细颗粒
氧化锌，%	48.5~57.0
铅，mg/kg	≤10.00
砷，mg/kg	≤3.0

4. 烟酸粉（烟酰胺、单、双甘油脂肪酸酯、二氧化硅）

项 目	指 标
来源	烟酰胺、单、双甘油脂肪酸酯、二氧化硅
制法	烟酰胺原料与熔化的单-双甘油酯混合，形成悬浊液。将配制完成的液体进行喷雾干燥（进风口温度：80~90℃，出风口温度：40~50℃）。加入二氧化硅作为助流剂，混合后进行筛分和包装。
感官要求	白色至淡黄色粉末
烟酰胺，%	≥32.6
水分，%	≤1.0
灼烧残渣，%	≤1.3
重金属，mg/kg	≤20

5. 维生素A粉（棕榈酸视黄酯、明胶、蔗糖、玉米淀粉、维生素E）

项 目	指 标
来源	棕榈酸视黄酯、明胶、蔗糖、玉米淀粉、维生素E
制法	棕榈酸视黄酯原料检验合格后，进行微胶囊化后包装。
感官要求	淡黄色颗粒
维生素A，IU/g	≥250000.00
水分，%	≤8.0

6. 维生素E（d- α -琥珀酸生育酚）：应符合GB 1886.233《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素E》的规定。

7. 维生素D₃粉（胆钙化醇、阿拉伯胶、蔗糖、玉米淀粉、中链甘油三酯、维生素E、二氧化硅）

项 目	指 标
来源	胆钙化醇、阿拉伯胶、蔗糖、玉米淀粉、中链甘油三酯、维生素E、二氧化硅
制法	维生素D ₃ 检验合格，然后进行微胶囊化，最后包装。
感官要求	白色至淡黄色颗粒
维生素D ₃ ， IU/g	76000~110000
水分， %	≤8.0
菌落总数， CFU/g	≤1000
霉菌和酵母， CFU/g	≤100

8. 泛酸粉（D-泛酸钙、氢化植物油）

项 目	指 标
来源	D-泛酸钙、氢化植物油
制法	D-泛酸钙、氢化植物油原料检验合格后，进入流化床微胶囊处理，过20目筛，包装。
感官要求	白色粉末
水分， %	≤5.0
重金属， mg/kg	≤20.00
泛酸， %	≥43.00

9. 维生素B₂粉（核黄素、氢化植物油）

项 目	指 标
来源	核黄素、氢化植物油
制法	核黄素原料检验合格后，进入流化床微胶囊处理，过20目筛，包装。
感官要求	橙色粉末
核黄素， %	32.60~35.30
水分， %	≤1.00
重金属， mg/kg	≤10
砷， mg/kg	≤3.0

10. 维生素B₆粉（盐酸吡哆醇、氢化植物油）

项 目	指 标
来源	盐酸吡哆醇、氢化植物油
制法	盐酸吡哆醇原料检验合格后，进入流化床微胶囊处理，过20目筛，包装。
感官要求	白色粉末
盐酸吡哆醇， %	32.60~35.30
水分， %	≤0.75
重金属， mg/kg	≤30
粒度：通过20目网筛， %	99~100

11. 维生素B₁粉（硝酸硫胺素、氢化植物油）

项 目	指 标
来源	硝酸硫胺素、氢化植物油
制法	硝酸硫胺素原料检验合格后，进入流化床微胶囊处理，过20目筛，包装。
感官要求	白色粉末
水分， %	≤1.00
硝酸硫胺素， %	32.60~35.30
粒度：通过20目网筛， %	99

12. 生物素粉（D-生物素、磷酸氢钙）

项 目	指 标
来源	D-生物素、磷酸氢钙
制法	生物素原料检验合格后，进行微胶囊化后包装。
感官要求	白色粉末
生物素， mg/g	≥10.0

13. 吡啶甲酸铬

项 目	指 标

来源	吡啶甲酸铬
制法	甲基吡啶酸与三价铬盐在水溶液中反应，得吡啶甲酸铬沉淀，经离心机与母液分离后水洗、烘干、粉碎、过筛、包装。
感官要求	淡红色粉末
铬， $\mu\text{g/g}$	120000.00~130000.00
六价铬	不得检出
水分，%	≤ 4.0
重金属， mg/kg	≤ 10
铅， mg/kg	≤ 2.0
菌落总数， CFU/g	≤ 1000
霉菌和酵母， CFU/g	≤ 100

14. 叶酸粉（叶酸、棕榈油、二氧化硅）

项 目	指 标
来源	叶酸、棕榈油、二氧化硅
制法	叶酸原料检验合格后，进行微胶囊化，筛分后包装。
感官要求	黄色粉末
叶酸，%	24.5~29.5
水分，%	≤ 8.5
重金属， mg/kg	≤ 10.0
砷， mg/kg	≤ 3.0

15. 维生素B₁₂粉（氰钴胺、磷酸氢钙）

项 目	指 标
来源	氰钴胺、磷酸氢钙
制法	氰钴胺原料检验合格后，进行微胶囊化后包装。
感官要求	粉色颗粒
氰钴胺素，%	1.00~1.15
水分，%	≤ 10.0
菌落总数， CFU/g	≤ 1000
霉菌和酵母， CFU/g	≤ 100
大肠菌群， MPN/g	≤ 3.0
沙门氏菌	不得检出

16. 木糖醇粉（木糖醇、羧甲基纤维素钠）

项 目	指 标
来源	木糖、羧甲基纤维素钠
制法	木糖原料溶于饮用水，加入氢气在催化剂的作用下进行氢化反应。然后经脱色，离子交换（电导率小于50us/cm,透光100%）除杂后，加入羧甲基纤维素钠过滤（压力：0.1MPa-0.4MPa），进行蒸发浓缩。
感官要求	白色颗粒
木糖醇，%	≥ 96.0
水分，%	≤ 0.50
灼烧残渣，%	≤ 0.50
铅， mg/kg	≤ 5.0
砷， mg/kg	≤ 3.0
镍， mg/kg	≤ 2.0

17. 碳酸钙粉（碳酸钙、山梨糖醇、麦芽糊精、二氧化硅）

项 目	指 标
来源	碳酸钙、山梨糖醇、麦芽糊精、二氧化硅
制法	碳酸钙、山梨糖醇、麦芽糊精、二氧化硅混合后，进行造粒，干燥后包装
感官要求	白色颗粒
钙，%	18.75~20.30
水分，%	≤ 3.0
砷（以As计），ppm	≤ 3
铅， mg/kg	≤ 0.5

18. 微晶纤维素粉（微晶纤维素、二氧化硅）

项 目	指 标
来源	木浆
制法	木浆经切碎，加入盐酸水解（121~132℃，15~40 min），用去离子水洗除盐酸，加入氢氧化胺溶液中和，用二氧化硅混合，喷雾干燥（进风温度170~220℃），过筛后包装
感官要求	白色粉末
pH	5~7
干燥失重，%	≤6.0
重金属，mg/kg	≤10.0
水溶物，%	≤0.24
灼烧残留，%	1.8~2.2
菌落总数，CFU/g	≤1000
霉菌和酵母菌，CFU/g	≤50
沙门氏菌	不得检出
金黄色葡萄球菌	不得检出

19. 葡萄糖：应符合GB 15203《食品安全国家标准 淀粉糖》的规定。

20. 麦芽糊精：应符合GB 15203《食品安全国家标准 淀粉糖》的规定。

21. 食品用香精（草莓味）：应符合GB 30616《食品安全国家标准 食品用香精》的规定。

22. 硬脂酸镁：应符合GB 1886.91《食品安全国家标准 食品添加剂 硬脂酸镁》的规定。

23. 食品用香精（酸橙味）：应符合GB 30616《食品安全国家标准 食品用香精》的规定。

24. 食品用香精（芒果味）：应符合GB 30616《食品安全国家标准 食品用香精》的规定。

25. 姜黄素：应符合GB 1886.76《食品安全国家标准 食品添加剂 姜黄素》的规定。

26. 二氧化硅：应符合GB 25576《食品安全国家标准 食品添加剂 二氧化硅》的规定。
