

## 附2

# 国家市场监督管理总局 保健食品产品技术要求

国食健注G20070291

## 易优牌维生素B片

【原料】

【辅料】

【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】

【感官要求】 应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	指 标
色泽	黄色
滋味、气味	具本品特有气味，无其他异味
性状	片剂
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
水分, g/100g	≤4.0	GB 5009.3
灰分, g/100g	≤4.0	GB 5009.4
崩解时限, min	≤20	《中华人民共和国药典》（2010年版）二部
铅（以Pb计）， mg/kg	≤0.5	GB 5009.12

砷（以As计），mg/kg	≤0.3	GB/T 5009.11
汞（以Hg计），mg/kg	≤0.3	GB/T 5009.17

【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	≤1000	GB 4789.2
大肠菌群，MPN/100g	≤40	GB/T 4789.3-2003
霉菌，cfu/g	≤25	GB 4789.15
酵母，cfu/g	≤25	GB 4789.15
致病菌（沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌）	不得检出	GB 4789.4、GB/T 4789.5、GB 4789.10、GB/T 4789.11

【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B1，mg/g	1.12~2.52	GB/T 5009.197
维生素B2，mg/g	1.04~2.34	GB/T 5009.85
维生素B6，mg/g	1.06~2.38	GB/T 5009.197
烟酸，mg/g	10.55~23.74	GB/T 5009.197
叶酸，mg/g	0.33~0.74	1 叶酸的测定
泛酸钙，mg/g	3.97~8.93	2 泛酸钙的测定

## 1 叶酸的测定

### 1.1 仪器与设备

#### 1.1.1 恒温培养箱

#### 1.1.2 离心机

#### 1.1.3 高压消毒锅

#### 1.1.4 振荡器

#### 1.1.5 接种针和接种环

#### 1.1.6 分光光度计

### 1.2 试剂

除特殊注明外，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

#### 1.2.1 菌种：酪乳酸杆菌（*Lactobacillus casei*, L.C., ATCC7469）

1.2.2 磷酸缓冲液（pH6.8）：称取4.35g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10.39g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，溶解于800mL水中。临用前用约5g抗坏血酸调节pH值至6.8。

1.2.3 鸡胰酶 (Difco公司, 0459-12-2) 溶液 (5mg/mL): 临用前称取100mg鸡胰酶粉, 加入20mL磷酸缓冲液研磨成匀浆, 3000r/min离心10min, 取上清液备用。

1.2.4 蛋白酶-淀粉酶溶液 (10mg/mL): 分别称取200mg蛋白酶和淀粉酶, 加入20mL磷酸缓冲液制成匀浆, 3000r/min离心10min, 取上清液备用。临用前现配。

1.2.5 叶酸标准溶液

1.2.5.1 叶酸标准储备液 (200 $\mu$ g/mL): 用0.01mol/L氢氧化钠乙醇溶液配制。储存于棕色瓶中。

1.2.5.2 叶酸标准中间液 (200ng/mL)

1.2.5.3 叶酸标准使用液 (0.2ng/mL): 用磷酸缓冲液稀释并定容。

1.2.5.4 叶酸标准溶液标定: 吸取1mL叶酸标准储备液, 用0.1mol/L NaOH定容至25mL。以0.1mol/L NaOH调零点, 用1cm比色杯, 在256nm波长处测定3次吸光度值, 取平均值, 按下式计算浓度。

$$X = \frac{A}{E} \times M \times 25 \times 10^3$$

式中:

X—叶酸标准储备液浓度,  $\mu$ g/mL;

A—标准中间液平均吸光度值;

E—摩尔消光系数24500;

M—维生素K<sub>1</sub>相对分子质量441.42;

10<sup>3</sup>—由g/L换算成 $\mu$ g/mL的系数。

1.2.6 酶解酪蛋白溶液: 将8g碳酸氢钠溶解于1L水中, 加入60g去维生素酪蛋白, 用10mol/L NaOH调节pH值8.0。加入300mg胰酶, 搅拌20min, 使胰酶充分混匀。再加入2.5mL甲苯, 置37 $^{\circ}$ C恒温箱中酶解48~72h。将酪蛋白液从恒温箱中取出, 121 $^{\circ}$ C高压水解30min。冷却后加10g硅藻土搅拌, 用布氏漏斗过滤。滤液中加入约60mL冰乙酸调节pH值3.7。称取活性炭12g, 加入滤液中搅拌10min, 用布氏漏斗过滤 (漏斗内铺有10g硅藻土), 重复3次, 最后滤液用水稀释至1200mL。液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内可保存1年。

1.2.7 乙酸缓冲液 (1.7mol/L, pH4.5): 取38.65g乙酸钠、19.8mL乙酸, 加水稀释至500mL。液面加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.8 黄嘌呤溶液: 取0.4g黄嘌呤, 加入10mL氨水, 加热溶解, 用水稀释至100mL。液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.9 腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液: 分别称取硫酸腺嘌呤、盐酸鸟嘌呤、尿嘧啶各0.2g, 加入20%HCL溶液10mL, 加热溶解, 用水稀释至100mL, 液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.10 维生素溶液: 取10mg核黄素溶解于40mL乙酸缓冲液 (1.7mol/L, pH4.5) 中。取0.2mg生物素、2.5mg NaHCO<sub>3</sub>、20mg对氨基苯甲酸、40mg盐酸吡多醇、4mg盐酸硫胺素、8mg泛酸钙、8mg烟酸溶解于50mL水中。将上述两种溶液混合, 加水至100mL。液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.11 吐温-80溶液 (2%): 液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.12 还原型谷胱甘肽溶液 (GSH) (1mg/mL): 液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.13 甲盐溶液: 含5%磷酸氢二钾、2%磷酸二氢钾, 液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.14 乙盐溶液: 含2%硫酸镁、0.5%硫酸亚铁、0.5%硫酸锰, 液面上加入少许甲苯, 于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。

1.2.15 基础培养基: 将酶解酪蛋白溶液100mL、腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液2.5mL、黄嘌呤溶液2.5mL、吐温-80溶液2.5mL、维生素溶液5mL、L-盐酸半胱氨酸0.2g、L-天冬氨酸0.3g、还原型谷胱甘肽溶液2.5mL、色氨酸0.2g、乙酸钠20g、葡萄糖20g、乙盐溶液2.5mL、甲盐溶液2.5mL混合, 用10mol/L氢氧化钠调节pH值6.8, 加入磷酸缓冲液20.0mL, 用水稀释至500mL。

1.2.16 琼脂培养基: 取葡萄糖1g、蛋白胨0.8g、酵母提取物干粉0.2g、乙酸钠 (NaAc·3H<sub>2</sub>O) 1.7g、甲盐溶液0.2mL、乙盐溶液0.2mL、琼脂1.2g加水至100mL, 置水浴煮至琼脂完全溶化, 调节pH值 (6.8 $\pm$ 0.1)。尽快倒入试管中, 每管3~5mL, 塞上棉塞, 121 $^{\circ}$ C高压灭菌15min, 取出后直立试管, 冷却至室温, 于冰箱内保存。

### 1.3 菌种制备与保存

1.3.1 储备菌种的制备：将L. C. 纯菌种转接至2个或多个琼脂培养基管中。37±0.5℃恒温培养箱中培养16~24h。贮于冰箱内，每周转种一次留作储备菌种。

1.3.2 种子培养液的制备：取2mL叶酸标准使用液、10mL基础培养基，混匀，分装至4支5mL离心管中，塞上棉塞，121℃高压灭菌15min，实验时现制备。

1.3.3 接种液的制备：接种前一天，用灭菌的接种针将菌种由储备菌种管中转种至2支已灭菌的种子培养液中，37±0.5℃恒温培养箱中培养16~24h。混悬种子培养液，取0.2mL转移至另2支无菌的种子液培养中，37±0.5℃再培养6h。振荡混匀，立即使用。

### 1.4 测定步骤（所有操作均需避光进行）

1.4.1 样品处理：准确吸取样品0.5~2mL（约含叶酸100~300ng），同上高压水解后，加入1mL鸡胰酶、1mL甲苯，于37±0.5℃恒温箱内酶解16~20h。酶解后定容至100mL，过滤。另取一支试管作酶空白。

1.4.2 样品管的制备：将上述滤液用磷酸缓冲液做适当稀释，使叶酸的终浓度为0.1~0.4ng/mL。取4支试管，每支试管中分别加入样品液1.0、2.0、3.0、4.0mL，补充水至体积为5.0mL，再加5mL基础培养基，混匀。同样制作酶空白管。将以上标准系列管、样品管和酶空白管全部塞上棉塞，121℃高压灭菌15min。在无菌操作条件下每根测定管接种一滴接种液于37±0.5℃恒温培养箱中培养30~40h。

1.5 标准曲线的绘制：按上法制作标准系列管，使系列管中叶酸含量分别为0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ng，培养后测定光密度值。并绘制标准曲线。

1.6 样品测定：用分光光度计于540nm波长处，以未接种的标准零管调零点，测定标准管、样品管和酶空白管的光密度值。以样品管和酶空白管的光密度值，从标准曲线上查得相应的叶酸含量。

### 1.7 结果计算

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \times V_1 \times n}{m \times V_2} \times \frac{100}{1000}$$

式中：

X—样品中叶酸含量，μg/100g；

m<sub>1</sub>—从标准曲线上查得样品测定管中叶酸含量，ng；

m<sub>2</sub>—从标准曲线上查得酶空白管中叶酸含量，ng；

V<sub>1</sub>—样品定容体积，mL；

n—稀释倍数；

V<sub>2</sub>—样品测定管中加入的样品液体积，mL；

m—样品质量，g；

100

—— 一样品含量由ng换算成μg/100g的系数。

1000

## 2 泛酸钙的测定

2.1 原理：试样中的泛酸钙用水提取，HPLC分离，保留时间定性，标准曲线法定量。

### 2.2 试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为去离子水或同等纯度的水。

2.2.1 乙腈：色谱纯

2.2.2 磷酸

2.2.3 硫酸锌溶液：取硫酸锌3g，加水溶解并定容至20mL。

2.2.4 磷酸二氢钾

2.2.5 泛酸钙标准溶液：准确称取0.5000g泛酸钙标准品，置100mL容量瓶中，加水溶解并稀释至100mL。取1.0mL该液，用水稀释50倍，即为100μg/mL的标准溶液。

### 2.3 仪器

- 2.3.1 HPLC系统：附色谱工作站、C18柱
- 2.3.2 超声震荡器
- 2.3.3 实验室常用玻璃仪器
- 2.4 色谱条件
- 2.4.1 ODS柱：250mm
- 2.4.2 流动相：0.02mol/L磷酸二氢钾-乙腈=92:8（先用磷酸调节pH值3.7左右，再用磷酸将pH值准确定位到3.0）。
- 2.4.3 流速：1mL/min
- 2.4.4 检测波长：210nm
- 2.5 样品处理：将样品磨碎，称取约0.5g（取样量视泛酸钙含量而定），精密称定于100mL容量瓶中，加入水30mL，振荡5min，超声30s，再继续振荡数分钟，加硫酸锌溶液10mL，充分混匀，加水至刻度，摇匀，过0.45μm滤膜，滤液即为样品处理液。
- 2.6 标准曲线制备：用水配制10.0、25.0、50.0、75.0、100.0μg/mL的系列标准溶液。在2.4项色谱条件下各进样10μL，测定峰面积，绘制标准曲线。
- 2.7 样品测定：在2.4项色谱条件下，进样品处理液10μL测定，以保留时间定性，标准曲线法定量。
- 2.8 结果计算

$$X = \frac{C \times V}{M}$$

式中：

X—样品中泛酸钙的含量，μg/g；

C—样品处理液中泛酸钙的含量，μg/mL；

V—样品定容体积，mL；

M—取样量，g。

【装量或重量差异指标/净含量及允许负偏差指标】

【原辅料质量要求】

---

确认打印

显示Office编辑区

返回上一页修改