

国家市场监督管理总局
保健食品产品技术要求

国食健注G20170475

善存佳维牌多种维生素矿物质片

【原料】 β-胡萝卜素粉（β-胡萝卜素、辛烯基琥珀酸淀粉钠、玉米淀粉、葡萄糖浆、抗坏血酸钠、DL-α-生育酚）、维生素D₃粉（胆钙化醇、明胶、蔗糖、玉米淀粉、部分氢化大豆油、DL-α-生育酚）、维生素E粉（DL-α-生育酚醋酸酯、麦芽糊精、辛烯基琥珀酸淀粉钠、二氧化硅）、维生素B₂（核黄素）、维生素B₆（盐酸吡哆醇）、维生素C粉（L-抗坏血酸、羟丙基甲基纤维素、酒石酸）、维生素B₁₂粉（氰钴胺素、辛烯基琥珀酸淀粉钠、柠檬酸钠、柠檬酸、二氧化硅）、生物素粉（D-生物素、无水磷酸氢钙）、叶酸、烟酰胺、泛酸（D-泛酸钙）、碳酸钙粉（碳酸钙、麦芽糊精）、碳酸镁、富马酸亚铁、硫酸铜、氧化锌、硫酸锰

【辅料】 微晶纤维素、硬脂酸镁、二氧化硅、羧甲基淀粉钠、薄膜包衣预混剂（羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、滑石粉、日落黄铝色淀、诱惑红铝色淀、二氧化钛）

【生产工艺】 本品经过筛、混合、压片、包衣、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】 口服固体药用高密度聚乙烯瓶应符合《口服固体药用高密度聚乙烯瓶》（YBB00122002）；药用聚酯/铝/聚乙烯封口垫片应符合《药用聚酯/铝/聚乙烯封口垫片》（YBB00152005）。

【感官要求】 应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	指 标
色泽	包衣呈桃红色；片芯呈带有细小斑点的白色至类黄色
滋味、气味	具本品固有的滋味、气味，无异味。
性状	光滑、完整的薄膜包衣片
杂质	无正常视力可见外来异物

【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, %	≤5	GB 5009.3中“第二法 减压干燥法”
灰分, %	≤67	GB 5009.4
崩解时限, min	≤60	《中华人民共和国药典》
铅（以Pb计），mg/kg	≤2.0	GB 5009.12中“第一法 石墨炉原子吸收光谱法”，按干法灰化进行试样消解
总砷(以As计)，mg/kg	≤1.0	GB 5009.11
总汞(以Hg计)，mg/kg	≤0.3	GB 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	≤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
β-胡萝卜素, mg/g	0.88~1.98	1 β-胡萝卜素的测定方法
维生素 D, μg/g	1.41~3.17	2 维生素D ₃ 的测定方法
维生素 E（以 α-生育酚当量计），mg/g	7.06~15.9	3 维生素E的测定方法
维生素 B ₂ , mg/g	0.330~0.742	4 维生素 B ₂ 、维生素B ₆ 、烟酰胺、叶酸、泛酸的测定方法
维生素 B ₆ , mg/g	0.330~0.742	4 维生素 B ₂ 、维生素B ₆ 、烟酰胺、叶酸、泛酸的测定方法
维生素 C, mg/g	29.0~65.3	5 维生素C的测定方法
维生素 B ₁₂ , μg/g	0.659~1.48	6 维生素B ₁₂ 的测定方法
生物素, μg/g	8.56~19.3	7 生物素的测定方法
叶酸, μg/g	120~236	4 维生素 B ₂ 、维生素B ₆ 、烟酰胺、叶酸、泛酸的测定方法

烟酰胺 ,mg/g	3.95~8.89	4 维生素 B ₂ 、维生素B ₆ 、烟酰胺 、叶酸、泛酸的测定方法
泛酸 ,mg/g	1.46~3.28	4 维生素 B ₂ 、维生素B ₆ 、烟酰胺 、叶酸、泛酸的测定方法
钙（以Ca计）, mg/g	148~206	8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定方法
镁（以Mg计）, mg/g	58.8~91.9	8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定方法
铁（以Fe计）, mg/g	3.53~5.89	8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定方法
铜（以Cu计）, mg/g	0.297~0.441	8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定方法
锌（以Zn计）, mg/g	3.00~5.00	8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定方法
锰（以Mn计）, mg/g	0.930~1.55	8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定方法

1 β-胡萝卜素的测定

1.1 原理：样品中的β-胡萝卜素经甲苯：甲醇(2:1) (v/v)（含0.1% 2, 6-二叔丁基对甲酚）溶液萃取后，用高压液相色谱，紫外检测器外标法定量测定。

1.2 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

1.2.1 碱性蛋白酶6-L:Bio-Cat。

1.2.1 异丙醇：色谱纯。

1.2.3 甲醇：色谱纯。

1.2.4 甲基叔丁基醚：色谱纯。

1.2.5 甲苯：色谱纯。

1.2.6 三乙醇胺（TEA）：分析纯。

1.2.7 氨水(25%-28%)：分析纯。

1.2.8 乙酸铵：分析纯。

1.2.9 氯化钠：分析纯。

1.2.10 2, 6-二叔丁基对甲酚（BHT）99%：分析纯。

1.2.11 85%磷酸：分析纯。

1.2.12 4%氨水(pH 9.5)：吸取143mL 氨水(25%)至1L容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。用85%磷酸调pH至9.5。

1.2.13 0.1% BHT甲苯溶液：1g 2, 6-二叔丁基对甲酚溶于1L 甲苯。

1.2.14 0.1% BHT异丙醇溶液：1g 2, 6-二叔丁基对甲酚溶于1L 异丙醇。

1.2.15 甲苯：甲醇(2:1) (v/v)（含0.1% BHT）-1.2g 2, 6-二叔丁基对甲酚溶于800mL甲苯和400mL甲醇中，混匀。

1.2.16 碱性蛋白酶溶液：取1mL碱性蛋白酶6-L置100mL容量瓶中，加水稀释至刻度并摇匀。（注：碱性蛋白酶溶液必须临用新配。）

1.2.17 甲醇（含0.01%TEA和0.05 mol/L乙酸铵）：加3.85g乙酸铵和100μL TEA到1L甲醇，混匀。

1.2.18 β-胡萝卜素(Beta-Carotene)对照品：约20%（W/W）。

1.3 仪器

1.3.1 常用实验室仪器及50 mL离心管。

1.3.2 超声波清洗器。

1.3.3 离心机。

1.3.4 振荡器。

1.3.5 高压液相色谱仪：具可变波长的紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

1.4 操作步骤：照高效液相色谱法，按《中华人民共和国药典》测定，避光操作。

1.5 系统适用性试验：用三十烷基硅烷键合硅胶为填充剂(建议色谱柱：YMC Carotenoid C30 column， 4.6mm×250mm， 5

μm)，以甲醇（含0.01%TEA和0.05 mol/L乙酸铵）为A相，甲基叔丁基醚为B相，按表A1进行梯度洗脱；流速为1.0 mL/min；检测波长为415nm；柱温为30℃，进样量为10μL。待基线平稳后，用对照品溶液重复进样6次，β-胡萝卜素总峰面积的RSD应不大于3.0%，反式（trans）β-胡萝卜素的拖尾因子应在0.75~2.0之间。（注：出峰顺序为cisA β-胡萝卜素；transβ-胡萝卜素；cisBβ-胡萝卜素。其中，transβ-胡萝卜素是三个色谱峰中间的最大色谱峰）

表A1：色谱系统梯度洗脱程序：

时间，minutes	溶液A，%	溶液B，%
0.0	90.0	10.0
2.0	90.0	10.0
20.0	60.0	40.0
30.0	10.0	90.0
33.0	10.0	90.0
33.1	90.0	10.0
40.0	90.0	10.0

注：梯度洗脱程序可根据实际情况进行适当调整。

1.6 对照品溶液的制备：精密称量20mg β-胡萝卜素对照品置于100mL棕色容量瓶中。加10.0mL 4%氨水（pH 9.5）置容量瓶中。加1.0mL碱性蛋白酶溶液，密塞，摇匀。置55℃水浴超声15min，不断用手振摇。放冷至室温。加约1.6g氯化钠，混匀；然后，精密量取30.0mL甲苯：甲醇（2:1）（v/v）（含0.1% BHT）溶液至棕色容量瓶中，密塞，摇匀；机械振摇20min。转移上层溶液至离心管中，3000转/min离心使分层（约5min）。移取5.0mL上清液，置于50mL棕色容量瓶，用0.1% BHT甲苯溶液定容，摇匀。移取上步溶液5.0mL置于25mL棕色容量瓶。用0.1% BHT异丙醇溶液定容，摇匀，经0.45μm滤膜过滤，取续滤液，此为对照品溶液。

1.7 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成细粉。精密称取约3.2片量样品粉末，置于100mL棕色容量瓶。加4%氨水（pH 9.5）25mL。加碱性蛋白酶溶液1.0mL，密塞，摇匀。置55℃水浴超声15min，不断用手振摇。然后冷至室温。加4g氯化钠，精密加入40.0mL甲苯：甲醇（2:1）（v/v）（含0.1% BHT）溶液置棕色容量瓶，密塞，摇匀。机械振摇20min。转移上层溶液约40mL至50mL避光离心管。3000转/min离心约5min，移取2.0mL上层溶液，置于25mL棕色容量瓶，用0.1% BHT甲苯溶液定容，摇匀，此溶液为样品储备溶液；吸取上步溶液5.0mL，置于25mL棕色容量瓶，用0.1% BHT异丙醇溶液定容，摇匀，经0.45μm滤膜过滤，取续滤液，此为样品溶液。

1.8 测定：分别注入等体积（10μL）的对照品溶液和样品溶液，测定。

1.9 结果计算

$$\text{样品中}\beta\text{-胡萝卜素的含量 (mg/g)} = \frac{A_s \times c \times f}{A_{st} \times W \times 1000}$$

式中：

- A_s—样品溶液的β-胡萝卜素峰面积；
- A_{st}—对照品溶液的β-胡萝卜素峰面积；
- C—对照品溶液的浓度，μg/mL；
- f—样品稀释因子，mL；
- W—样品的重量，g。

2 维生素D₃的测定

2.1 原理：样品中的维生素D₃经正己烷萃取后，用高压液相色谱，紫外检测器外标法定量测定。

2.2 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

- 2.2.1 异丙醇：色谱纯。
- 2.2.2 正己烷：色谱纯。
- 2.2.3 二甲亚砜：分析纯。

2.2.4 二甲亚砷的水溶液（75%）：750mL二甲亚砷中加入250mL纯水，混匀。

2.2.5 维生素D₃对照品(Cholecalciferol):纯度约100%。

2.3 仪器

2.3.1 常用实验室仪器及50 mL离心管。

2.3.2 离心机。

2.3.3 振荡器。

2.3.4 超声波清洗器。

2.3.5 高压液相色谱仪：具可变波长的紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

2.4 操作步骤：照高效液相色谱法，按《中华人民共和国药典》测定，避光操作。

2.5 系统适用性试验：用硅胶为填充剂(建议色谱柱：Supelcosil-LC-SI 4.6mm×250mm, 5μm)，以0.45%异丙醇的正己烷溶液为A相，20%异丙醇的正己烷溶液为B相，按表A2进行梯度洗脱；流速为1.0 mL/min；检测波长为265nm；进样量为40μL；柱温为25℃。待基线平稳后，分别进对照品溶液和样品溶液。对照品溶液重复进样6次，维生素D₃峰面积的RSD应不大于3.0%，维生素D₃的拖尾因子不大于2.0。

表A2：色谱系统梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相B (%)
0.00	100	0
25.00	100	0
26.00	0	100
30.00	0	100
31.00	100	0
37.00	100	0

注：A相中的异丙醇可以在0.1~0.5%的范围内适当调整；梯度洗脱程序可根据实际情况进行适当调整。

2.6 对照品溶液的制备：精密称取25mg维生素D₃对照品于100mL棕色容量瓶中。加适量正己烷使溶解，并稀释至刻度，摇匀，为标准储备溶液。精密量取5.0mL标准储备溶液于100mL棕色容量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，为中间标准储备溶液；精密量取5.0mL该中间标准储备溶液于100mL棕色容量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，即为维生素D₃对照品溶液。

(注：维生素D₃标准储备溶液可在2~8℃冰箱保存14天)

2.7 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成细粉，精密称取约2片量样品粉末，于50mL离心管中（注意避光操作）。加入约20mL二甲亚砷的水溶液（75%），密塞，摇匀。将离心管置于45℃±5℃水浴超声15min，并时时振摇离心管；然后，冷却至室温。精密加入15.0mL正己烷，机械振摇90min。3000转离心约5min，取上清液，即为样品溶液。

2.8 测定：分别注入等体积（40μL）的对照品溶液和样品溶液。

2.9 结果计算

$$\text{样品中维生素D}_3\text{的含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{A_s \times c \times f \times 1.09}{A_{st} \times W}$$

式中：

A_s—样品溶液的峰面积；

A_{st}—对照品溶液的峰面积；

c—对照品溶液的浓度，μg/mL；

f—样品稀释因子；

W—样品的重量，g；

1.09—USP转换因子用于计算维生素D₃总量，包括Vitamin D₃和Pre-vitamin D₃。

3 维生素E的测定

3.1 原理：样品中的维生素E经7%冰醋酸溶液破包衣后，溶解于异丙醇-冰醋酸混合溶液，用高压液相色谱，紫外检测器外标法定量测定。

3.2 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

3.2.1 甲醇：色谱级。

3.2.2 异丙醇：色谱纯。

3.2.3 甲基叔丁基醚：色谱纯。

3.2.4 冰醋酸：分析纯。

3.2.5 2%/7%冰醋酸溶液：分别吸取2mL/7mL冰醋酸至100mL容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。

3.2.6 维生素E醋酸酯油(DL-Alpha Tocopheryl Acetate Oil)对照品：纯度约100%

3.3 仪器

3.3.1 常用实验室仪器及50 mL离心管。

3.3.2 超声清洗器。

3.3.3 机械振摇器。

3.3.4 离心机。

3.3.5 高压液相色谱仪：具可变波长的紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

3.4 操作步骤：照高效液相色谱法，按《中华人民共和国药典》测定，避光操作。

3.5 系统适用性试验：用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(建议色谱柱：Waters Resolve C18， 3.9mm×300mm， 5um)，以甲醇为A相，水为B相，甲基叔丁基醚为C相，按表A3进行梯度洗脱；流速为1.5 mL/min；检测波长为265nm，柱温为25℃，进样量为50μL。待基线平稳后，用对照品溶液重复进样6次，维生素E峰面积的RSD不大于3.0%，维生素E的拖尾因子均不大于2.0。

表A3：色谱系统梯度洗脱程序， A：甲醇； B：水； C：甲基叔丁基醚

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相B (%)	流动相C (%)
0.0	92	8	0
15.0	92	8	0
15.1	97	3	0
36.0	97	3	0
36.1	100	0	0
38.0	100	0	0
38.1	40	0	60
40.0	40	0	60
40.1	100	0	0
42.0	100	0	0
42.1	92	8	0
45.0	92	8	0

注：梯度洗脱程序可根据实际情况进行适当调整。

3.6 对照品溶液的制备：准确称取48mg维生素E醋酸酯油对照品到100mL避光容量瓶中，加10mL 预热至47℃的2%冰醋酸溶液，置于47℃水浴振摇10min；加约70mL预热至47℃的异丙醇，漩涡混匀，置于47℃水浴振摇10min，放冷至室温，异丙醇定容至刻度。此为维生素E标准储备液。取50.0mL维生素E标准储备液于100mL容量瓶中，用异丙醇定容至刻度，混匀。此为维生素E对照品溶液。

3.7 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成细粉。精密称取约1片量样品粉末，置100mL避光容量瓶。加15mL 预热至60℃的7%冰醋酸溶液，置于60℃水浴振摇10min；再于60℃水浴超声处理15min。加约35mL预热至60℃的异丙醇，漩涡混匀，置于60℃水浴振摇10min，冷却至室温，异丙醇定容至刻度。此溶液离心后取上清液，即得，为样品溶液。

3.8 测定：分别注入等体积（50μL）的对照品溶液和样品溶液，测定。

3.9 结果计算

$A_s \times c \times f$

$$\text{样品中维生素E的含量(以}\alpha\text{-生育酚计, mg/g)} = \frac{\text{Ast} \times W \times 1.49}{\text{As}}$$

式中:

As—样品溶液的峰面积;

Ast—对照品溶液的峰面积;

c—对照品溶液的浓度, mg/mL;

f—样品稀释因子;

W—样品的重量, g;

1.49—1mg维生素E(以 α -生育酚当量计)相当于1.49mg维生素E醋酸酯。

4 维生素B₂、维生素B₆、烟酰胺、叶酸、泛酸的测定

4.1 原理: 样品中的维生素B₂、维生素B₆、烟酰胺、叶酸、泛酸在弱酸性缓冲溶液中经提取后, 用高压液相色谱, 紫外检测器外标法定量测定。

4.2 试剂

所有试剂, 如未注明规格, 均指分析纯; 所有实验用水, 如未注明其他要求, 均指三级水。

4.2.1 甲醇: 色谱纯。

4.2.2 二甲基亚砜(DMSO): 试剂级。

4.2.3 冰醋酸: 试剂级。

4.2.4 碳酸钠: 试剂级。

4.2.5 磷酸(85%): 试剂级。

4.2.6 磷酸二氢钾(KH₂PO₄): 试剂级。

4.2.7 己烷磺酸钠(C₆H₁₃NaO₃S): 色谱级。

4.2.8 硫氰酸铵:(NH₄CNS): 试剂级。

4.2.9 硫酸钠(Na₂SO₄): 试剂级。

4.2.10 碳酸钠溶液: 4.0g碳酸钠, 加4000mL水溶解, 混匀。

4.2.11 提取液: 在1L的容量瓶中, 称取5g硫氰酸铵, 960mL的DMSO和40mL冰醋酸, 混匀至溶解。

4.2.12 稀释液: 称取28.4g硫酸钠, 加80mL冰醋酸, 再加3920mL水混匀。

4.2.13 STD 稀释液: 取100mL提取液和900mL稀释液混匀。

4.2.14 维生素B₂(Riboflavin)对照品: 约100%。

4.2.15 维生素B₆(Pyridoxine HCl)对照品: 约100%。

4.2.16 烟酰胺(Niacinamide)对照品: 约100%。

4.2.17 泛酸钙(Calcium Pantothenate)对照品: 约100%。

4.2.18 叶酸(Folic acid)对照品: 约91%。

4.3 仪器

4.3.1 常用实验室仪器。

4.3.2 水浴恒温振荡器。

4.3.3 振荡器。

4.3.4 pH计。

4.3.5 高压液相色谱仪: 具可编程的紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

4.4 操作步骤: 照高效液相色谱法, 按《中华人民共和国药典》测定, 避光操作。

4.5 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱: Agilent Zorbax poroshell 120EC-C18 2.7 μ m 100mm $\times$ 4.6mm, 或具同等性能的色谱柱; 流动相A: 称取1.2g己烷磺酸钠和3.4g磷酸二氢钾溶于1L超纯水中, 用10%的磷酸溶液调pH至4.0; 甲醇为流动相B, 按表A4进行梯度洗脱; 流速为1.0 mL/min; 检测波长: 250nm处烟酰胺; 210nm处泛酸; 280nm处维生素B₂, 维生素B₆和叶酸; 各组分的出峰顺序为: 烟酰胺; 泛酸; 维生素B₆; 叶酸; 维生素B₁; 维生素B₂; 进样量为10 μ L; 柱温为30 $^{\circ}$ C。开始时检测波长250nm, 当烟酰胺出峰结束后, 波长转为210nm, 等泛酸出峰结束后再调到280nm。连续6针对照品各峰面积的RSD应不大于2.0%; 分离度不低于2.0; 所有主峰的拖尾因子不超过2.0。

表A4：色谱系统梯度洗脱程序

时间(min)	流动相A	流动相B
0.00	95	5
4.00	95	5
16.00	75	25
20.00	75	25
20.50	95	5
24.00	95	5

注意：因为食品级样品中干扰测定的杂质峰较多，可通过调整两相梯度的比例来调节色谱峰的分离程度，并同步调整检测波长的时间范围。

4.6 对照品溶液的制备：取150mg 烟酰胺、27mg维生素B₆、80mg泛酸钙对照品，精密称定，置于200mL棕色容量瓶中，加20 mL提取液，超声5min。再加20mL稀释液，超声5min。再加100mL稀释液，机械振摇30min。最后用稀释液稀释至刻度，摇匀。此溶液为标准储备液A。

取25mg维生素B₁、26mg维生素B₂对照品，精密称定，置于200mL棕色容量瓶中，加20mL提取液，超声5min。再加20mL稀释液，超声5min。再加100mL稀释液，机械振摇30min。最后用稀释液稀释至刻度，摇匀。此溶液为标准储备液B。

取28mg 叶酸对照品，精密称定，置100mL棕色容量瓶中，加75mL碳酸钠溶液，超声5min，用碳酸钠溶液稀释至刻度。此溶液为标准储备液C。

精密移取2.0mL标准储备液C于100mL棕色容量瓶中，加适量STD稀释液，摇匀，再精密移取20.0mL标准储备液A和10.0mL标准储备液B，用STD稀释液稀释至刻度，摇匀，用0.45μm的滤膜过滤，即得对照品溶液。

（注：标准储备液A和B在2~8℃冰箱保存20天内稳定。标准储备液C在2~8℃冰箱保存23天内稳定。）

4.7 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成粉末。准确称取约2片量样品粉末，置于100mL棕色容量瓶中。加入10mL提取液到容量瓶中，振荡至完全湿润样品粉末，超声5min；加10mL稀释液到容量瓶中，超声5min；加60mL稀释液，机械振摇30min。用稀释液定容至刻度，混匀，用0.45μm的滤膜过滤，即得样品溶液。

4.8 测定：分别取对照品溶液和样品溶液10μL注入液相色谱仪。

4.9 结果计算

$$\begin{aligned} \text{样品中维生素B}_2\text{的含量 (mg/g)} &= \frac{A_s \times c \times f}{A_{st} \times W} \\ \text{样品中维生素B}_6\text{的含量 (mg/g)} &= \frac{A_s \times c \times f}{A_{st} \times W} \\ \text{样品中烟酰胺的含量 (mg/g)} &= \frac{A_s \times c \times f}{A_{st} \times W} \\ \text{样品中叶酸的含量 (}\mu\text{g/g)} &= \frac{A_s \times c \times f \times 1000}{A_{st} \times W} \\ \text{样品中泛酸的含量 (mg/g)} &= \frac{A_s \times c \times f \times 0.92}{A_{st} \times W} \end{aligned}$$

式中：

A_s—样品溶液的峰面积；

A_{st}—对照品溶液的峰面积；

C—对照品溶液的浓度，mg/mL；

f—样品稀释因子，mL；

W—样品的重量，g；
1000—mg至μg的转换因子；
0.92—泛酸和泛酸钙的转换因子。

5 维生素C的测定

5.1 原理：样品中的维生素C溶解于水后，采用电位滴定法用碘液滴定。

5.2 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

5.2.1 乙醇95%：试剂级。

5.2.2 硫酸：试剂级。

5.2.3 碘滴定液：0.05mol/L。

5.2.4 0.2mol/L硫酸：吸取22.0mL的浓硫酸至约含1500mL纯水的2000mL容量瓶中，摇匀，冷却后定容，再混匀。

5.2.5 0.05mol/L硫酸：吸取5.5mL的浓硫酸至约含1500mL纯水的2000mL容量瓶中，摇匀，冷却后定容，再混匀。

5.2.6 维生素C(Ascorbic Acid)对照品，纯度约100%。

5.3 仪器

5.3.1 常用实验室仪器

5.3.2 磁力搅拌器

5.3.3 电位滴定仪：METTLER TOLEDO DL53 Titrator；

5.3.4 电极：DMI140-SC氧化还原滴定用复合铂丝电极；

5.3.5 滴定杯：250mL玻璃滴定杯

5.4 系统验证

5.4.1 系统验证溶液的制备：准确称取60mg维生素C对照品至250mL大口径滴定杯中。用20mL乙醇完全润湿标准品。加入90mL 0.05mol/L的硫酸至大口径滴定杯。加入50mL纯水。用搅拌棒或用搅拌转子在搅拌器上将溶液混匀。

5.4.2 系统验证步骤：浸没铂电极到系统验证溶液中，0.05mol/L的碘滴定液滴定，电位滴定法确定终点。每1mL的碘滴定液(0.05mol/L)相当于8.806mg的维生素C。系统验证溶液中计算所得的维生素C的含量应在维生素C标准品实际含量的97%~103%范围内。

5.5 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成细粉。准确称取约1片量样品粉末至250mL的大口径滴定杯中。加入20mL乙醇，将样品完全润湿。加入90mL 0.2mol/L的硫酸至大口径滴定杯。加入50mL纯水。用搅拌棒或用搅拌转子在搅拌器上将溶液混匀。（注意：为确保充分混匀，可将样品溶液高速搅拌，在系统里可设置转速。维生素C水溶液易被空气氧化，因此溶液制备完后应尽快滴定，不要延误。）

5.6 样品溶液的滴定：浸没铂电极到样品溶液中，0.05mol/L的碘滴定液滴定，电位滴定法确定终点。每1mL的碘滴定液(0.05mol/L)相当于8.806mg的维生素C(C₆H₈O₆)。

5.7 结果计算

$$\text{样品中维生素C的含量(mg/g)} = \frac{V \times 8.806 \times NF}{W}$$

式中：

V—消耗0.05mol/L碘滴定液的毫升数；

8.806—每毫升0.05mol/L碘滴定液相当于维生素C的毫克数；

NF—0.05mol/L碘滴定液的浓度因子；

W—供试品的重量，g。

6 维生素B₁₂的测定

6.1 原理：本方法参考GB/T 5009.217-2008保健食品中维生素B₁₂的测定。样品中的维生素B₁₂经甲醇/0.5%硫氰酸铵溶液经提取后，用高压液相色谱，紫外检测器外标法定量测定。

6.2 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

- 6.2.1 乙腈：色谱级。
- 6.2.2 甲醇：色谱级。
- 6.2.3 磷酸：试剂级。
- 6.2.4 0.5%硫氰酸铵溶液：称取5g硫氰酸铵至1L的容量瓶中，用纯水定容。
- 6.2.5 0.1% 磷酸溶液：取2mL磷酸至2L的容量瓶中，用纯水定容。
- 6.2.6 甲醇/0.5%硫氰酸铵溶液（50/50）：将500mL的甲醇和500mL的0.5%硫氰酸铵溶液等量混匀。
- 6.2.7 0.1%磷酸溶液/乙腈（90/10）：将900mL的0.1%磷酸溶液和100mL的乙腈混匀。
- 6.2.8 维生素B₁₂对照品：纯度约100%

6.3 仪器

- 6.3.1 常用实验室仪器50 mL离心管
- 6.3.2 超声清洗器
- 6.3.3 机械振摇器
- 6.3.4 离心机
- 6.3.5 高压液相色谱仪：紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

6.4 操作步骤：照高效液相色谱法，按《中华人民共和国药典》测定，避光操作。

6.5 系统适用性试验：色谱柱：Waters Symmetry C18，4.6×250mm，5μm，或具同等性能的色谱柱。流动相：A相为0.1% H₃PO₄，B相为乙腈，见表A5色谱系统梯度表。流速为0.5 mL/min；检测器波长为550nm；柱温为25℃，进样量为200μL。待基线平稳后，用对照品溶液重复进样6次，维生素B₁₂峰面积的RSD不大于3.0%，维生素B₁₂的拖尾因子均不大于2.0。

表A5：色谱系统梯度表

时间（min）	0.1%H ₃ PO ₄ （MP A）	乙腈Ace（MP B）	流速（mL/min）
0.00	90	10	0.5
20.00	50	50	0.5
21.00	5	95	0.5
30.00	5	95	0.5
31.00	90	10	0.5
40.00	90	10	0.5

注：梯度洗脱程序可根据实际情况进行适当调整

- 6.6 对照品溶液的制备：准确称取29mg维生素B₁₂对照品到200mL棕色容量瓶中，用甲醇/0.5%硫氰酸铵溶液（50/50）溶解，机械振荡约15min，并定容至刻度，混匀，此溶液为标准储备液。移取4.0mL的标准储备液至200mL棕色容量瓶中；用0.1%磷酸溶液/乙腈（90/10）定容至刻度，混匀，此溶液为标准中间液。移取5.0mL标准中间液至100mL棕色容量瓶中。用0.1%磷酸溶液/乙腈（90/10）定容至刻度，混匀。此溶液为对照品溶液。
- 6.7 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成粉末。准确称取约3片量样品粉末，置于50mL避光离心管中；加25.0mL 甲醇/0.5%硫氰酸铵溶液（50/50）到离心管溶解，振荡，摇匀；高速机械振摇30min；离心管离心5min；移取1.0mL 0.1% 磷酸溶液至合适的避光容器中；移取2.0mL过滤后的样品溶液到同一避光容器中，混匀；上述溶液用0.45 μm的滤膜过滤至进样小瓶中。此溶液为样品溶液。
- 6.8 测定：分别注入等体积（200μL）的对照品溶液和样品溶液，测定。
- 6.9 结果测定

$$\text{样品中维生素B}_{12}\text{的含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{A_s \times c \times f}{A_{st} \times W}$$

式中：

- A_s—样品溶液的峰面积；
- A_{st}—对照品溶液的峰面积；
- C—对照品溶液的浓度，μg/mL；

f—样品稀释因子，mL；

W—样品的重量，g。

7 生物素的测定

7.1 原理：样品中的生物素经7.5%磷酸溶液溶解、水浴提取后，用高压液相色谱，紫外检测器外标法定量测定。

7.2 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

7.2.1 乙腈 (CH_3CN)：色谱级。

7.2.2 硫氰酸铵 (NH_4SCN)：试剂级。

7.2.3 甲醇：色谱级。

7.2.4 磷酸85% w/w (H_3PO_4)：色谱级。

7.2.5 二水合磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)：试剂级。

7.2.6 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)：试剂级。

7.2.7 标准稀释液：称取35.8g十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)到合适的容器中，加2L水溶解混匀。

7.2.8 0.5%硫氰酸铵 (w/v)：的甲醇：称取5g硫氰酸铵到1000mL甲醇中，溶解，混匀。

7.2.9 洗针溶液：10% v/v 乙腈/水。

7.2.10 7.5%磷酸溶液：量取88mL 85%磷酸溶液至1000mL容量瓶中，用水稀释定容。

7.2.11 Seal Wash 溶液：10% v/v 乙腈/水。

7.2.12 生物素对照品：纯度约100%。

7.3 仪器

7.3.1 常用实验室仪器。

7.3.2 50 mL离心管。

7.3.3 超声清洗器。

7.3.4 机械振摇器。

7.3.5 离心机。

7.3.6 高压液相色谱仪：紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

7.4 操作步骤：照高效液相色谱法，按《中华人民共和国药典》测定，避光操作。

7.5 系统适用性试验

色谱柱：Gemini C18，4.6mm×250mm，3 μm ，或具同等性能的色谱柱。预柱：GeminiC18，4.0mm×3.0mm，Phenomenex part#AJ0-7597(Guard Cartridge Kit，Phenomenex part# KJ0-4282)，或具同等性能的预柱。

流动相 A相：称取15.6g二水合磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和4.9g磷酸85%到2L的容器中，加2L的水，溶解，混匀；B相为通过0.45 μm 的滤膜过滤的标准稀释液；C相为50% v/v 乙腈/水。其中，流动相A中磷酸的量可在±10%的范围内适当调节，以满足更好的分离效果。按表A6色谱系统梯度表运行。

流速为1.0mL/min；检测器波长为210nm；柱温为45±2℃，进样量为400 μL 。待基线平稳后，用对照品溶液重复进样6次，生物素峰面积的RSD不大于2.0%。

表A6：色谱系统梯度表

时间(min)	流动相A，%	流动相B，%	流动相C，%
0.00	82.0	0.00	18.0
9.80	82.0	0.00	18.0
9.90	47.0	47.0	6.00
20.0	47.0	47.0	6.00
20.1	0.00	0.00	100
23.0	0.00	0.00	100
23.1	82.0	0.00	18.0
40.0	82.0	0.00	18.0

注：梯度洗脱程序可根据实际情况进行适当调整

7.6 对照品溶液的制备：准确称取25mg生物素对照品到100mL棕色容量瓶中，加约50mL标准稀释液，超声并不断振摇直至溶解（约1min），用标准稀释液定容至刻度，摇匀，此为标准储备液。移取3.0mL标准储备液至500mL棕色容量瓶中；用水定容至刻度，混匀，此溶液为对照品溶液。

7.7 样品溶液的制备：取样品20片，粉碎成粉末。准确称取约4片量样品粉末，置于100mL棕色容量瓶；加10mL 0.5%硫氰酸铵的甲醇，旋涡分散，超声5min。缓慢滴加50mL 7.5%磷酸溶液，边加边摇，直到反应平息。振摇。将样品置于65℃水浴15min。将样品移出水浴，趁热高速机械振摇15min。冷却至室温，用水定容至刻度，摇匀。将样品在3500r/min转速下离心5min。用0.2μm滤膜过滤上清液至进样小瓶中，初滤液丢弃。此溶液为样品溶液。注意：操作过程中一定要缓慢滴加50mL7.5%磷酸溶液，边加边摇，直到反应平息。

7.8 测定：分别注入等体积（400μL）的对照品溶液和样品溶液，测定。

7.9 结果计算

$$\text{样品中生物素的含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{A_s \times c \times f}{A_{st} \times W}$$

式中：

As—样品溶液的峰面积；

Ast—对照品溶液的峰面积；

C—对照品溶液的浓度，μg/mL；

f—样品稀释因子，mL；

W—样品的重量，g。

8 钙、铜、铁、锌、镁、锰的测定

8.1 原理：本方法参考GB 5413.21-2010婴幼儿食品和乳品中钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰的测定第二法。样品经混酸溶液消化，稀释至合适体积后用电感耦合等离子体原子发射光谱仪测定，内标法定量。

8.2 试剂

8.2.1 硝酸：优级纯。

8.2.2 盐酸：优级纯。

8.2.3 混酸溶液：取 750 mL盐酸和375 mL硝酸至2000mL容量瓶，用水稀释至接近刻度，冷却，用水定容至刻度，混匀。

8.2.4 参考标准溶液：Ca、Mg标准溶液：10000μg/mL ；Cu、Fe、Mn、Zn标准溶液：1000μg/mL。

8.2.5 参考标准溶液：钇(Y)标准溶液：1000μg/mL。

8.3 仪器

8.3.1 电热板

8.3.2 等离子发射光谱ICP

表A 7：等离子发射光谱参数（测试波长可根据不同的仪器型号进行适当的调整）

常量元素	波长（nm）
钙 Ca	317.933
铜 Cu	324.754
铁 Fe	259.940
镁 Mg	279.079
锰 Mn	257.610
锌 Zn	213.856
Y(IS) 钇（内标）	377.433

8.4 对照品溶液的制备

8.4.1 50μg/mL钇内标溶液的制备：吸取10.0mL1000μg/mL的钇标准溶液至200mL容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。该标准溶液为：50μg/mL Y（IS）。

8.4.2 100µg/mL铜标准溶液的制备：吸取10.0mL1000µg/mL的铜标准溶液至100mL容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。该标准溶液为：100µg/mL Cu标准溶液。

8.4.3 常量空白溶液的制备：吸取0.5mL的混酸溶液和2.0mL 50µg/mL Y（IS）至100mL容量瓶中，用水定容至刻度，混匀。该溶液为常量空白溶液。

8.4.4 常量储备标准溶液：吸取表A 8参考标准溶液至100mL容量瓶中，加20mL混酸溶液，用水定容至刻度，混匀。该复合储备标准溶液为：常量储备标准溶液。

表A 8：常量储备标准溶液

元素	标准溶液体积 (mL)	浓度 (µg/mL)
Ca, 10000µg/mL	8.0	800
Cu, 100µg/mL	2.0	2.0
Fe, 1000µg/mL	4.0	40
Mg, 10000µg/mL	2.0	200
Mn, 1000µg/mL	1.3	13
Zn, 1000µg/mL	4.0	40

8.5 常量工作标准溶液的制备：分别移取2.0、5.0、10.0、15.0、20.0mL常量储备标准溶液至5个100mL 容量瓶。分别加入2.0mL 50µg/mL钇内标溶液。纯水稀释至刻度，摇匀。（分别制备得常量工作标准溶液STD1，2，3，4，5）

8.6 常量工作标准溶液浓度

表A9：常量工作标准溶液浓度：

元素	Working STD1 Co nc. (µg/mL)	Working STD2 Co nc. (µg/mL)	Working STD3 Co nc. (µg/mL)	Working STD4 Co nc. (µg/mL)	Working STD5 Co nc. (µg/mL)
Ca	16	40	80	120	160
Cu	0.04	0.1	0.2	0.3	0.4
Fe	0.8	2.0	4.0	6.0	8.0
Mg	4	10.0	20.0	30.0	40.0
Mn	0.26	0.65	1.3	1.95	2.6
Zn	0.8	2.0	4.0	6.0	8.0
Y (IS)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

8.7 样品溶液的制备

8.7.1 常量样品储备溶液的制备：取样品20片，粉碎成细粉。精密称取相当于5片的样品粉末至250mL烧杯中，加50mL混酸，使其静置反应15min。将样品置于已预热的电热板上，温和加热并消化样品，避免煮沸，样品溶解后继续加热30min，不时搅拌。如果溶液开始沸腾，将烧杯从电热板上移开，当溶液停止沸腾后，再将烧杯置于电热板（注：在消化的最后10min内不要搅拌混匀）。将上层溶液转移至200mL容量瓶中；再加50mL混酸至原烧杯中，在电热板上进一步消化30min；将烧杯中溶液转移至上述200mL容量瓶中，用水冲洗，一并转移；冷却至室温，用水定容至刻度，混匀；用Whatman #541或相当滤纸过滤，弃去10-15mL初滤液。此滤液为常量样品储备溶液。

8.7.2 常量样品工作溶液的制备：移取3.0mL 常量样品储备溶液和5.0 mL 50µg/mL Y（IS）至250mL 容量瓶。纯水稀释至刻度，摇匀。此溶液为常量样品工作溶液。

8.8 系统适应性测试系统平衡后，测试空白溶液和标准工作液，线性回归系数 r^2 应 ≥ 0.99 ， $r \geq 0.995$ 。连续读取3次读数，要求钙、铁、镁、锰和锌的读值的相对标准偏差应不大于5.0%，铜的读值的相对标准偏差应不大于10.0%。

8.9 测定：按照仪器和参数项下的要求， 用空白液冲洗和稳定仪器，用工作标液校准常量元素的分析谱线，定出优化设置，分别在等离子发射光谱上测试对照品溶液和样品溶液，测定。

8.10 结果计算

$$\text{样品中钙、铜、铁、锌、镁、锰的含量 (mg/g)} = \frac{\text{Sp1. Conc} \times \text{DF}}{W \times 1000}$$

式中：

Sp1. Conc—测得样品溶液的浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；
DF—样品稀释因子，mL；
W—样品的重量，g；
1000— $1\text{mg}=1000\mu\text{g}$ 。

【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D₃粉

维生素D₃粉的质量指标

项目	指标
原料组成成分	胆钙化醇、明胶、蔗糖、玉米淀粉、部分氢化大豆油、DL- α -生育酚
主要生产工序	溶解、乳化、喷雾、干燥（进风温度约77-93℃）、分装
性状	类白色至淡黄色的易流动的颗粒
鉴别	（TLC）供试品溶液所显主斑点的颜色和位置应与维生素D3对照品溶液1的主斑点相同
维生素D ₃ 含量，IU/g	100000~110000。
砷, mg/kg	≤ 2
铅, mg/kg	≤ 2
菌落总数，cfu/g	≤ 1000
霉菌、酵母菌，cfu/g	≤ 100

2. β -胡萝卜素粉

β -胡萝卜素粉的质量指标

项目	指标
原料组成成分	β -胡萝卜素、辛烯基琥珀酸淀粉钠、玉米淀粉、葡萄糖浆、抗坏血酸钠、DL- α -生育酚
主要生产工序	溶解、乳化、减压蒸馏、喷雾、干燥（约45-55℃）、分装
性状	红棕色的颗粒状粉末
β -胡萝卜素含量	$\geq 20\%$
砷, mg/kg	≤ 2
铅, mg/kg	≤ 2
菌落总数，cfu/g	≤ 1000
霉菌、酵母菌，cfu/g	≤ 100

3. 维生素E醋酸酯粉

维生素E醋酸酯粉的质量指标

项目	指标
原料组成成分	DL- α -生育酚醋酸酯、麦芽糊精、辛烯基琥珀酸淀粉钠、二氧化硅

主要生产工序	溶解、乳化、喷雾干燥（进风温度约77-93℃）、混合、分装
性状	本品为白色至浅黄色粉末。
鉴别	在含量测定项下记录的色谱图中，供试品主峰的保留时间应与维生素E对照品峰的保留时间一致
维生素E含量	≥50.0%
砷, mg/kg	≤ 2
铅, mg/kg	≤ 2
菌落总数, cfu/g	≤1000
霉菌、酵母菌, cfu/g	≤100

4. 生物素粉

生物素粉的质量指标

项目	指标
原料组成成分	D-生物素、无水磷酸氢钙
主要生产工序	混合，分装
性状	本品为白色粉末；无臭，无味
鉴别	在含量测定项下，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致
生物素含量	应为标示量的100.0%~120.0%
砷, mg/kg	≤ 2
铅, mg/kg	≤ 2
菌落总数, cfu/g	≤1000
霉菌、酵母菌, cfu/g	≤100

5. 维生素B₁₂粉

维生素B₁₂粉的质量指标

项目	指标
原料组成成分	氰钴胺素、辛烯基琥珀酸淀粉钠、柠檬酸钠、柠檬酸、二氧化硅
主要生产工序	溶解、喷雾干燥（进风温度约77-93℃）、混合、分装
性状	粉红色细粉
鉴别	溶液在361±2 nm 和 550±3 nm 有最大吸收
维生素B ₁₂ 含量	≥1.0%
砷, mg/kg	≤ 2
铅, mg/kg	≤ 2
菌落总数, cfu/g	≤1000
霉菌、酵母菌, cfu/g	≤100

6. 碳酸钙粉

碳酸钙颗粒的质量指标

项目	指标
原料组成成分	碳酸钙、麦芽糊精
主要生产工序	制粒，干燥(约110℃)，过筛，包装
性状	白色至类白色有流动性的颗粒

鉴别	符合规定
钙含量	$\geq 37.0\%$
碳酸钙含量	$\geq 92.4\%$
铅, mg/kg	≤ 2.0
砷, mg/kg	≤ 1.0
菌落总数, cfu/g	≤ 1000
霉菌、酵母菌, cfu/g	≤ 100

7. 维生素C粉

维生素C粉的质量指标

项目	指标
原料组成成分	抗坏血酸、羟丙基甲基纤维素、酒石酸
主要生产工序	粉碎、配料、湿法混合制粒、筛整、混合烘干（60～90℃）、包装
性状	白色或类白色颗粒
维生素C含量（以干品计）	96.0%-98.0%
铅, mg/kg	≤ 2
砷, mg/kg	≤ 2
菌落总数, cfu/g	≤ 1000
霉菌、酵母菌, cfu/g	≤ 100

8. 碳酸镁：符合GB 25587《食品安全国家标准 食品添加剂 碳酸镁》的规定。

9. 硫酸锰：符合GB 29208《食品安全国家标准 食品添加剂 硫酸锰》的规定。

10. 硫酸铜：符合GB 29210《食品安全国家标准 食品添加剂 硫酸铜》的规定。

11. 叶酸：符合GB 15570《食品安全国家标准 食品添加剂 叶酸》的规定。

12. 烟酰胺：符合《中华人民共和国药典》的规定。

13. 维生素B₆（盐酸吡哆醇）：符合GB 14753《食品添加剂 维生素B₆（盐酸吡哆醇）》的规定。

14. 维生素B₂（核黄素）：符合GB 14752《食品添加剂 维生素B₂（核黄素）》的规定。

15. 富马酸亚铁：符合《中华人民共和国药典》的规定。

16. 氧化锌：符合GB 1903.4《食品安全国家标准 食品营养强化剂 氧化锌》的规定。

17. 泛酸（D-泛酸钙）：符合《中华人民共和国药典》的规定。

18. 薄膜包衣预混剂

薄膜包衣预混剂的质量指标

项目	指标
组成成分	羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、滑石粉、日落黄铝色淀、诱惑红铝色淀、二氧化钛

主要生产工序	称量、初混、过筛、总混、包装
外观	本品为色泽均匀的颗粒或粉末
色差	样品制备的供试卡片与标准品卡的色差应符合下列要求： $\Delta E \leq 2.5$
砷，mg/kg	≤ 1.0
铅，mg/kg	≤ 2.0
红外鉴别	与对照品图谱一致
灰分，%	24.6~33.4

19. 二氧化硅：符合《中华人民共和国药典》的规定。

20. 羧甲基淀粉钠：符合《中华人民共和国药典》的规定。

21. 硬脂酸镁：符合《中华人民共和国药典》的规定。

22. 微晶纤维素：符合《中华人民共和国药典》的规定。
