イ　製剤

(ア)　成分規格

本品は、*d*-ビオチン製造用原体に、賦形物質を混和した粉末又は粒子である。

含量　本品は、定量するとき、表示量の90～120%に相当する*d*-ビオチン（$C_{10}H_{16}N_2O_3S$）を含む。

確認試験　本品を粉末とし、表示量に従い、*d*-ビオチン製造用原体４mgを含む量を量り、ジメチルホルムアミド１mLを加え、振り混ぜた後、エタノール20mLを加え、10分間加温し、ろ過する。ろ液５mLに硫酸の無水エタノール溶液（２→100）１mLを加え、さらに、*p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒドの無水エタノール溶液（２→1,000）１mLを加え、１時間放置するとき、溶液は、橙赤色を呈する。

定量法　本品を粉末とし、試料とする。デキストリンで希釈した製剤及び保存剤としてソルビン酸等の有機酸を添加したものにあっては第２法を、その他のものにあっては第１法を用いる。

第１法　*d*-ビオチン（$C_{10}H_{16}N_2O_3S$）約３mgを含む量の本品を有効数字３桁まで量り、その数値を記録し、フラスコに入れ、無水エタノール30mLを加え、還流冷却器を付け、水浴中で45分間加熱する。次に、常温まで冷却し、50mLの全量フラスコに移し、フラスコを無水エタノール10mLで洗い、洗液は全量フラスコに合わせ、無水エタノールを標線まで加えて50mLとし、ろ過する。初めのろ液20mLを除き、次のろ液を試料溶液とする。別に、定量用*d*-ビオチン約６mgを0.01mgの桁まで量り、その数値を記録し、無水エタノールを加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、更に無水エタノールを標線まで加えて100mLとして、標準液とする。試料溶液及び標準液２mLずつを全量ピペットを用いて量り、それぞれ20mLの全量フラスコに入れ、それぞれに硫酸の無水エタノール溶液（２→100）２mL及び*p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒドの無水エタノール溶液（２→1,000）２mLを全量ピペットを用いて加える。更に無水エタノールを標線まで加えて20mLとし、振り混ぜた後、室温に１時間放置する。別に、無水エタノール２mLを量り、同様に操作して得た溶液を対照液とし、波長530nm付近の極大波長における吸光度A_T及びA_Sを測定する。

$$d\text{-ビオチン（}C_{10}H_{16}N_2O_3S\text{）の量（mg）}=\text{定量}d\text{-ビオチンの量（mg）}\times\frac{A_T}{A_S}\times\frac{1}{2}$$

第２法　*d*-ビオチン（$C_{10}H_{16}N_2O_3S$）約１mgを含む量の本品を有効数字３桁まで量り、その数値を記録し、アンモニア水（８→40）30mLを加え、30秒以内にチオ硫酸ナトリウム溶液（２→1,000）150mLを加え、ときどき振り混ぜながら30分間放置する。次に、1,000mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて1,000mLとし、ろ過する。ろ液50mLを全量ピペットを用いて量り、0.1mol/L塩酸試液でpH9.0に調整した後、100mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて100mLとし、試料溶液とする。別に、定量用*d*-ビオチン約10mgを0.1mgの桁まで量り、その数値を記録し、アンモニア水（８→40）１mLを加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて100mLとし、標準原液とする。標準原液１mLを全量ピペットを用いて量り、200mLの全量フラスコに入れ、水を標線まで加えて200mLとし、標準液とする（用時調製）。試料溶液及び標準液につき、次の試験条件で、微生物定量法により試験を行う。

培地

①　試験菌保存用寒天培地

酵母エキス	20g
ブドウ糖	10g
ペプトン	5g
ポリソルベート80	0.1g
リン酸二水素カリウム	2g
寒天	10g

以上を量り、水を加えて1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.7とする。

②　試験菌増菌用液状培地

酵母エキス	20g
ブドウ糖	10g
カゼイン製ペプトン	5g
ポリソルベート80	0.1g
リン酸二水素カリウム	2g

以上を量り、水を加えて1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.7とする。

③　定量用基礎培地

ブドウ糖	40g
酢酸ナトリウム	20g
カザミノ酸	14g
L-シスチン	400mg
DL-トリプトファン	200mg
ウラシル	20mg
塩酸グアニン	20mg
硫酸アデニン	20mg
塩酸チアミン	0.8mg
塩酸ピリドキシン	0.8mg
ニコチン酸	0.4mg
パントテン酸カルシウム	0.4mg
リボフラビン	0.4mg
p-アミノ安息香酸	0.2mg
リン酸一水素カリウム	1g
リン酸二水素カリウム	1g
硫酸マグネシウム	400mg
硫酸第一鉄	20mg
硫酸マンガン	20mg

以上を量り、水を加えて500mLとし、滅菌する。pHは、6.7～6.9とする。別に、寒天溶液（３→100）を調製し、滅菌する。これらの溶液を熱時等量混合し、45℃の水浴中に保存する。

試験菌及び試験菌液の調製

試験菌として*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を用いる。試験菌は、試験菌保存用寒天培地５mLを試験管に加え、斜面培地とし、約１か月間隔で継代培養(37℃, 18～24時間）し、４～８℃で保存する。この保存試験菌に滅菌した生理食塩液５mLを加え、菌体を均等に浮遊させ、その0.5～1.0mLを試験菌増菌用液状培地30mLに接種し、37℃で18～20時間培養する。培養後、遠心分離して菌体を沈殿させ、上澄液を除き、沈殿した菌体に滅菌した生理食塩液30mLを加え、振り混ぜた後、再び遠心分離する。この操作を再度繰り返した後、菌体を滅菌した生理食塩液５mLに均等に浮遊させて試験菌液とする。

操作法

定量用基礎培地80mLに試験菌液４mLを加え、混合し、あらかじめ50℃に加温した滅菌平板（20×20cm）に流し込み、均一な平板培地を調製する。直径６mmのディスク８枚を１組として６組用意し、それぞれS_L、S_M、S_H、U_L、U_M及びU_Hとする。S_L、S_M及びS_Hのディスクには、それぞれ標準液５μL、10μL及び20μLをスポットし、U_L、U_M及びU_Hのディスクには、それぞれ試料溶液５μL、10μL及び20μLをスポットする。各組のディスク１枚ずつを平板培地に３cm以上の間隔で配置し、同様にして８枚の平板培地を作り、37℃で16～20時間培養する。