



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.16—1997

婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性） 的测定

Determination of folic acid (folate activity) in foods for infants and young children,
raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准修改采用国际公职分析化学家联合会（AOAC）992.05《婴儿配方中的叶酸的测定方法》。

本标准代替 GB / T 5413.16-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 叶酸（叶酸盐活性）测定》。

本标准与GB / T 5413.16-1997相比，主要变化如下：

- 对磷酸缓冲盐作了调整；
- 增加了米粉的处理方法；
- 增加了光密度法测定结果；
- 增加了微孔板试剂盒测试方法。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413-1985、GB/T 5413.16-1997。

婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定。

本标准检出限为 20 μ g/kg。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

叶酸盐的活性通过干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) (ATCC 7469) 的生长情况评价。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T6682规定的二级水。

4.1 鸡胰腺：称取 100mg 干燥的鸡胰腺，加 20mL 蒸馏水，搅拌 15min，离心 10min（3000r/min），取上清液用。现用现配。

4.2 0.9%生理盐水：9.0 克氯化钠溶解于 1000mL水中，分装于具塞试管中，每管 10mL，121 $^{\circ}$ C灭菌 15min。每周准备一次。

4.3 磷酸盐缓冲液

4.3.1 磷酸盐缓冲液 I：称取 5.85g 磷酸二氢钾，1.22g 磷酸氢二钾，用 1000mL 水溶解。临用前按 0.5g/100mL 的比例加入抗坏血酸。

4.3.2 磷酸盐缓冲液 II（用于谷物及谷物制品前处理）：称取 14.2g磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）用 1000mL水溶解。临用前按 1.0g/100mL的比例加入抗坏血酸，用 4mol/L NaOH调pH至为 7.8。

4.3.3 磷酸盐缓冲液 III（用于谷物及谷物制品测试）：称取 14.2g磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）用 1000mL水溶解。临用前按 1.0g/100mL的比例加入抗坏血酸，用 4mol/L NaOH调使pH为 6.8。

4.3.4 磷酸盐缓冲液 IV（用于谷物及谷物制品标准溶液制备）：0.1mol/L，pH7.0。溶解 13.61g磷酸二氢钾于水中然后稀释到 1000mL。用氢氧化钾溶液：c(KOH)为 4mol/L（3.10）调 pH 至 7.0。

4.4 叶酸：标准品。

4.5 浓氨水。

4.6 甲苯。

4.7 抗坏血酸

4.8 菌株：干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)ATCC 7469。

4.9 培养基

4.9.1 乳酸杆菌琼脂培养基：胨化乳 15g，酵母浸膏 5g，葡萄糖 10g，番茄汁 100mL，磷酸二氢钾 2g，聚山梨糖单油酸酯 1g，琼脂 10g，加蒸馏水至 1000mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2 （25 $^{\circ}$ C）。

4.9.2 乳酸杆菌肉汤培养基：胨化乳 15g，酵母浸膏 5g，葡萄糖 10g，番茄汁 100mL，磷酸二氢钾 2g，聚山梨糖单油酸酯 1g，加蒸馏水至 1000mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2 （25 $^{\circ}$ C）。

4.9.3 叶酸测定用培养基：酪蛋白胨 10g，葡萄糖 40g，乙酸钠 40g，磷酸氢二钾 1g，磷酸二氢钾 1g，DL-色氨酸 0.2g，L-天门冬氨酸 0.6g，L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g，硫酸腺嘌呤 10mg，盐酸鸟嘌呤 10mg，尿嘧啶 10mg，黄嘌呤 20mg，聚山梨糖 0.1g，谷胱甘肽 5mg，硫酸镁 0.4g，氯化钠 20mg，硫酸亚铁 20mg，硫酸锰 15mg，核黄素 1mg，p-氨基苯甲酸 2mg，维生素 B₆ 4mg，盐酸硫胺素 400μg，泛酸钙 800μg，烟酸 800μg，生物素 20μg，加蒸馏水至 1000mL，调 pH 至 6.7±0.1（25℃）。

(注：市售商业化合成培养基效果更稳定)

4.10 氢氧化钾溶液：KOH 为 4mol/L。

4.11 木瓜蛋白酶溶液：1g 蛋白酶(≥6000U/mg pH6.0, 40℃)溶于 100mL 磷酸盐缓冲液 I (3.3.1) 中。现用现配。

4.12 α-淀粉酶溶液：1g α-淀粉酶(1.5U/mg)溶于 100mL 磷酸盐缓冲液 I (3.3.1) 中。现用现配。

4.13 灭菌滤膜 (0.22μm)

4.14 标准溶液的制备

4.14.1 标准贮备液，叶酸的浓度 500μg/mL。

精确称取 55~56mg 叶酸标准品 (3.4)，用 50mL 蒸馏水定量地转入 100mL 容量瓶中，加 2 mL 浓氨水 (3.5)。溶液制备后，计算溶液的体积，要求贮备液中叶酸盐的浓度为 500μg/mL：

$$\text{贮备液体积 (mL)} = \frac{m \times 1000 \times c}{100 \times 500}$$

$$\text{或简化为：贮备液体积 (mL)} = \frac{m \times c}{50} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

m——标样的质量，mg；

c——标样的纯度，g/100g。

用蒸馏水稀释溶液至刻度，用吸管加蒸馏水至所要求的计算得到的体积，充分混合，放入红色或棕色瓶子中，贮于冰箱。保存期为 4 个月。

4.14.2 标准中间液，叶酸的浓度 50μg/mL。

精确吸取 10mL 标准贮备液 (3.14.1) 液于 100mL 棕色或红色容量瓶中，用蒸馏水稀至刻度，充分混合，贮于冰箱中，保存期 1 个月。

4.15 1mol/L 盐酸：83.0mL 浓盐酸 (37%，v/v) 溶于水中，冷却后定容至 1000mL。

5 仪器和设备

5.1

5.2 离心机。

5.3 分光光度仪。

5.3.1 分光光度仪。

5.3.2 酶标仪。

5.4 微孔板系统。

5.5 分析天平：感量 0.1mg。

6 分析步骤

6.1 菌株的制备

6.1.1 从干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 菌株培养基上转接一只乳酸杆菌琼脂培养基 (3.9.1) 试管, 37℃培养24h。

6.1.2 从菌株培养基试管 (5.1.1) 中接种一个乳酸杆菌肉汤培养基 (3.9.2) 试管, 37℃培养 24h。在无菌条件下离心该培养液 10min (2000r/min), 倾去上清液, 再用 10mL生理盐水 (3.2) 振荡洗涤菌体, 再离心 10min (2000r/min), 倾去上清液, 再用另外的 10mL生理盐水 (3.2) 清洗。如前面一样离心, 弃去上清液, 再加 10mL生理盐水 (3.2)。吸 1mL该菌悬液于 10mL生理盐水 (3.2) 中, 混合均匀。接种前在分光光度计上以 0.9%生理盐水 (3.2) 为空白, 加 0.9%生理盐水 (3.2) 调整菌液至 60%~80%之间, 即可使用。

6.2 试样的制备

6.2.1 乳制品

称取 2g(精确至 0.1mg)试样(约含叶酸 5 μ g),于 100mL 烧杯中, 用 25~30mL 水复原样品, 定量地转入 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 溶液中叶酸的质量浓度大约为 0.05 μ g (50ng) /mL。吸 1mL 该样液和 1mL 鸡胰腺 (3.1) 于一个 180mm×15mm 的带螺旋盖的试管中, 充分混合。加 18mL 0.05mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 (3.3.1), 再加 1mL 甲苯 (3.6)。作空白对照管, 吸 1mL 蒸馏水和 1mL 鸡胰腺 (3.1) 于空白管中, 加 0.05mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 I (3.3.1) 18mL 及 1mL 甲苯 (3.6)。在 37℃条件下, 样品管和空白管保温 16h 后, 于 100℃水浴加热 5min。用 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 I (3.3.1) 作适当稀释, 得到叶酸盐的质量浓度约为 0.1ng/mL 的溶液。

若确定样品中强化叶酸与原生叶酸相比所占比例很大则可以直接 1mL 样液加 19mL 0.05mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 I (3.3.1) 于 100℃水浴加热 5min, 再用 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 I (3.3.1) 稀释, 得到叶酸盐的质量浓度约为 0.1ng/mL 的溶液。

6.2.2 谷物及谷物制品

准确称取大约含 1 μ g叶酸的试样于 150mL三角烧瓶中。加 20mL pH7.8 磷酸缓冲溶液 II (3.3.2) 混匀后加 50mL水, 和 1.0mL甲苯 (3.6), 加盖后 121℃15min灭菌, 然后迅速冷却。加 1mL蛋白酶溶液 (3.11), 于 37℃保温 3h后 100℃加热 3min,冷却。加 1mL α -淀粉酶溶液 (3.12), 37℃保温 2h后加 4mL鸡胰腺 (3.1), 加盖 37℃保温 16h。保温后 100℃加热 3 min,冷却。用 1M盐酸 (3.15) 调整pH至 4.5。然后用水稀释定容到 100mL, 过滤得到澄清滤液, 然后吸取 1mL澄清滤液用磷酸盐缓冲液III (3.3.3) 定容至 100 mL, 得到叶酸盐的质量浓度大约为 0.1 ng/mL的溶液。

若确定样品中强化叶酸与原生叶酸相比所占比例很大则可以直接在样品中加 20mL 0.05mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 II (3.3.2) 和 50mL 水, 于 121℃灭菌 15min, 然后吸取 1mL 澄清滤液, 再用 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液III (3.3.3) 稀释, 得到叶酸盐的质量浓度约为 0.1ng/mL 的溶液。

6.2.3 如果使用 96 微孔板试剂盒测试, 按 5.2.1-5.2.2 步骤作, 得到叶酸盐的质量浓度约为 0.1ng/mL 的溶液, 用 0.22 μ m 膜过滤样液除菌存于 4℃暗处直到测试。

6.2.4 标准工作液, 叶酸的浓度: 低浓度 0.05ng/mL, 高浓度 0.1ng/mL。

吸取 1mL 标准中间液 (3.14.2) 于 100mL 棕色容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 混合。再吸该液 1mL 于 100mL 棕色容量瓶中, 定容, 混合。再从上液中分别吸 5mL 于 250mL 和 500mL 棕色容量瓶中, 用 0.05mol/L 磷酸缓冲液定容到刻度, 混合, 即为高浓度标准工作液 (0.0001 μ g/mL 或 0.1ng/mL) 和低浓度标准工作液 (0.00005 μ g/mL 或 0.05ng/mL)。每次测定前制备。

6.3 标准曲线的制备

按表 1 顺序加入蒸馏水, 标准工作液(5.2.4)(测定谷物及谷物制品的标准溶液用磷酸盐缓冲液IV (3.3.4) 代替磷酸盐缓冲液 I (3.3.1))和叶酸测定用培养基 (3.9.3) 于培养管中, 一式三份。

表 1

试管号 No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
蒸馏水, mL	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
标准溶液 1) mL	0	0	1	2	3	4	5	3	4	5
培养基, mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1) 试管 No.3~7 中加低浓度标准工作液; No.8~10 中加高浓度标准工作液。										

6.4 试样

按表 2 顺序加蒸馏水、样品溶液和叶酸测定用培养基于培养管内, 一式三份。

表 2

试管号 No	1	2	3	4
蒸馏水, mL	4	3	2	1
样品, mL	1	2	3	4
培养基, mL	5	5	5	5

6.5 灭菌

直接灭菌所有的试管, 制冷到培养温度或迅速放入循环水浴内, 以使颜色形成最浅。保证加热和制冷条件均匀(灭菌管数过多或距离太近, 在灭菌锅中都可产生不良影响)。121℃灭菌 10min。(商品化培养基按标签说明进行灭菌。)

6.6 接种

除标准管 No.1 以外, 无菌条件下接种每个管, 均加入 50μL 适当菌液。盖上盖, 充分振荡混合所有管。

6.7 培养

6.7.1 酸度法: 在 30℃~40℃之间选择一个恒定温度(±0.5℃), 培养 72h。通过对每个试管的目测检查进行反应的预测, 未接种管应是澄清的, 标准样品和样品管中生长应有梯度且无其他菌生长。试管若被其他微生物污染则测定无效。

6.7.2 光密度法: 在 30℃~40℃之间选择一个恒定的温度(±0.5℃) 培养 16h~24h。其他同 6.6.1。

6.8 测定

6.8.1 光密度法: 以接种空白管做对照, 选取适当的震荡时间和读数时间, 在 550nm 波长条件下测最高浓度标样管的透光率, 2 小时后同等条件重新测该管的透光率, 二次光密度之差结果≤2%, 则取出全部检验管测其光密度法。

6.8.2 酸度法

6.8.2.1 滴定

用溴麝香草酚蓝作指示剂, 用 0.1mol/L 氢氧化钠滴定每个管中溶液, 或以 pH6.8 作为电位滴定终点。如果接种空白滴定反应等于或高于未接种空白水平的 1.5mL, 则测定结果应忽略不计。通常标准溶液在 5.0mL 的反应等于 0.1mol/L 氢氧化钠 8~12mL 的滴定度。

6.8.2.2 测 pH 数值

培养之后读出管内溶液的 pH 数值, 近似至 0.01pH 数值单位。

6.9 标准曲线的绘制

根据微生物生长的特点, 在对数期和平台期不同的生长规律把标准溶液曲线分成两段对数曲线。以标样叶酸含量作横坐标, 光密度(酸度, pH 值)为纵坐标作曲线。绘制标准曲线原则尽量使曲线平滑, 尽量使线穿过两个离散点的中间。

对每个浓度的检验溶液进行维生素的定量测定, 舍弃低于 0.5mL 标准溶液的吸收值或高于 4.

5mL 标准溶液的吸收值。

对每个浓度的检验溶液，计算其每毫升中的叶酸含量。计算所得值的平均数，每个浓度的测量值不得超过该平均值的±15%。如果所得到的可用于计算管数少于总管数的 2/3，必须重做；如果可用于计算的管数占总管数的 2/3 或更多，则可根据平均值计算其样品中的含量。

7 结果计算和表示

试样中叶酸含量 X ，以质量分数（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）表示，按下式计算：

$$X = [(Cx \times D) - EB] \times \frac{100}{1000m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

Cx ——从标准曲线中查出试样种叶酸的含量，ng；

D ——样品在处理后的稀释因子；

EB ——鸡胰腺空白管中叶酸含量，ng/mL；

m ——样品的质量或体积，g（或 mL）。

100——换算成每 100g 表达。

1000——ng 换算成 μg 的换算系数。

计算结果以二次独立测定结果的算术平均值表示，计算结果要求保留到小数点后一位。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。