



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.17—1997

婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定

Determination of pantothenic acid 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

本标准第一法为等同采用国际分析家学会（AOAC）945.74《泛酸的测定》方法。

本标准代替GB/T 5413.17—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 泛酸的测定》。

本标准与GB/T 5413.17—1997相比，第一法主要变化如下：

- 增加了对 tris 缓冲液配制方法；
- 确定了测定波长；
- 增加了标准曲线绘制的文字描述。

第二法主要变化如下：

- 更换了色谱柱；
- 改变了流动相；
- 增加了含淀粉类试样进行酶解的处理方法。

本标准的附录A为资料性附录。

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 5413.17—1997。

婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定方法。

本标准第一法和第二法均适用于婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定。

本标准第二法检出限为 1mg/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

第一法 微生物法

3 原理

通过植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 产生的酸度或形成的光密度的测定来计算泛酸的含量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯试剂，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 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℃灭菌 15min。每周准备一次。

4.2 泛酸钙：标准品。

4.3 乙酸：c(HAc)为 0.2mol/L。吸 12mL 冰乙酸用蒸馏水稀释至 1000mL。

4.4 甲苯。

4.5 乙酸钠：c(NaAc)为 0.2mol/L。溶解 16.4g 无水乙酸钠于水中，稀释至 1000mL。

4.6 菌株：植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014。

4.7 培养基。

4.7.1 乳酸杆菌琼脂培养基：光解脲 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℃）。

4.7.2 乳酸杆菌肉汤培养基：光解脲 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℃）。

4.7.3 泛酸测定用培养基：葡萄糖 40g，乙酸钠 20g，无维生素酸水解酪蛋白 10g，磷酸氢二钾 1g，磷酸二氢钾 1g，L-胱氨酸 0.4g，L-色氨酸 0.1g，硫酸镁 0.4g，氯化钠 20mg，硫酸亚铁 20mg，硫酸锰 20mg，硫酸腺嘌呤 20mg，盐酸鸟嘌呤 20mg，尿嘧啶 20mg，胡萝卜素 400μg，盐酸硫胺素 200μg，生物素 0.8μg，p-氨基苯甲酸 200μg，烟酸 1mg，盐酸吡哆醇 800μg，聚山梨糖单油酸酯 0.1g，加蒸馏水至 1000mL，调 pH 至 6.7±0.1（25℃）。

4.8 Tris 缓冲液：称 24.2g Trizma Base 烧杯中 加 200mL 水溶解。

5 仪器和设备

5.1 分光光度仪

5.2 pH 计

5.3 漩涡振荡器

5.3 分析天平:感量 0.1mg。

6 分析步骤

6.1 菌株的制备

6.1.1 从植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ATCC 8014 贮备菌种培养基上分别转接到三个乳酸杆菌琼脂培养基(4.7.1)试管中,放入培养箱中 37℃培养 24h。每月转接一次,作为月接种管贮于冰箱中。再从月接种的培养管中的一支再接种 1 支乳酸杆菌琼脂培养基(4.7.1)试管,37℃培养 24h,作为日接种管每日测定用。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

6.1.2 从日接种管中接种一管乳酸杆菌肉汤培养基(4.7.2),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(4.1)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(4.1)清洗。如前面一样离心,弃去上清液,再加 10mL 生理盐水(4.1)。吸 1mL 该菌悬液于 10mL 生理盐水(4.1)中,混合均匀。

6.1.3 分光光度计,于 550nm 波长下,以生理盐水(4.1)做对照,测 6.1.2 菌悬液的光密度值,此值应在 60%~80%之间。

6.2 标准溶液的制备

6.2.1 泛酸标准贮备液:浓度 40μg/mL。

精确称取 45~55mg 泛酸钙标准品(4.2),溶于 500mL 蒸馏水中,加 10mL 乙酸(4.3),加 100mL 乙酸钠(4.5),用水稀释至泛酸钙精确浓度为 43.47μg/mL(即泛酸浓度为 40μg/mL),加甲苯(4.4)贮于冰箱中。

6.2.2 泛酸中间贮备液:浓度 1μg/mL。

取 25mL 标准贮备液(6.2.1),加入大约 500mL 蒸馏水,乙酸 10mL(4.3),乙酸钠 100mL(4.5),再用水稀释至 1L。加甲苯(4.4)贮于冰箱中。

6.2.3 泛酸标准工作液:高浓度的为 10ng/mL,低浓度的为 5ng/mL。

吸 5.0mL 中间贮备液(6.2.2),用蒸馏水稀至 500mL。每次测定前制备。

吸 5.0mL 中间贮备液(6.2.2),用蒸馏水稀至 1000mL。每次测定前制备。

6.3 试样的处理

称取一定量的试样,加入 10mL Tris 缓冲液(4.8),再加足量的水,121℃水解 15min,冷却,调 pH 至 4.5,然后定容至 250mL,过滤,吸 4mL 滤液,稀释至泛酸的浓度约为 5ng/mL,待用。

6.4 标准曲线的制备

按表 1 顺序加蒸馏水、标准溶液和泛酸测定用培养基于培养管中,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, 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 中加低浓度的为标准溶液; No.8~10 中加高浓度的为标准溶液。

6.5 试样

按表 2 顺序加入蒸馏水、试样和培养基于试管中,一式三份。

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
---------	---	---	---	---

6.6 灭菌

将 6.4 和 6.5 中所有的试管于 121℃ 灭菌 5min, 迅速冷却到培养温度, 使颜色形成最浅。尽量保证加热和冷却过程中条件均匀(灭菌管数过多或距离太近, 在灭菌锅中都可产生不良影响)。将 6.1.2 中的菌悬液用毛细滴管向上述试管内各加一滴(其中标准溶液中试管 No.1 除外), 混匀, 37℃±0.5℃ 培养 19~20h。

6.7 接种

在无菌条件下每管中均加入 50μL 适当菌液, 盖上盖, 充分振荡混合所有管(标准管 No. 1 以除外)。

6.8 培养

在 30℃~40℃ 之间选择一个恒定的温度(±0.5℃) 培养 16h~24h。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, 标准试样和试样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。

6.9 测定

以接种空白管做对照, 在振荡 5 秒, 波长 550nm 条件下读取最高浓度标准试样管的光密度, 2h 后同等条件重新测该管的光密度, 二次光密度(T°)之差结果≤2%, 则取出全部检验管测定标准溶液和试样的光密度。

6.10 标准曲线的绘制

根据微生物阶段生长的特点, 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。以标样烟酸含量作横坐标, 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, 计算其每毫升中的泛酸含量。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试样中的含量。

7 结果计算和表示

试样中泛酸含量 X , 以质量分数(μg/100g)表示, 按式(1)计算:

$$X = \frac{C_x}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_x ——从曲线中查得的试样中泛酸的平均含量, μg;

F ——稀释因子;

m ——试样的质量, g。

计算结果以二次独立测定结果的算术平均平均值表示结果保留到小数一位。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

第二法 高效液相色谱法

9 原理

试样经热水提取等前处理后，经C₁₈色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量泛酸的含量。

10 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/T 6682规定的三级水。

10.1 乙腈：色谱纯。

10.2 盐酸溶液：c(HCl)为0.1mol/L。

10.3 硫酸锌：c(ZnSO₄)为10g/100mL。

10.4 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液：称取 6.8g 磷酸二氢钾，溶解于 800mL 水中，用磷酸调节 pH 为 3 后，定容至 1000mL，用 0.45μm 滤膜过滤。

10.5 泛酸标准溶液

10.5.1 泛酸标准储备液：浓度为 1mg/mL。

准确称取泛酸钙 1.087g，加水溶解并定容至 1000mL。

泛酸浓度=泛酸钙浓度×0.920

10.5.2 泛酸标准中间液：浓度为 0.1mg/mL

吸取标准储备液（11.5.1）10mL于100mL容量瓶中，加水定容。

11 仪器和设备

11.1 分析天平：感量 0.1mg。

11.2 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

11.3 超声波。

12 分析步骤

12.1 试样处理

12.1.1 不含淀粉类试样处理

称取混合均匀的固态试样约5g；液态试样约20g(精确到0.1mg)于150mL三角瓶中，固体试样加入约30mL40~50℃温水，振摇溶解后超声萃取20min。

12.1.2 含淀粉类试样处理

如果试样中含有淀粉，称取混合均匀的固态试样约5g；液态试样约20g（精确到0.1mg），加入高峰氏淀粉酶约0.2g，固体试样加入约30mL40~50℃温水振摇溶解，盖上瓶塞，在50~60℃条件下酶解30min。

12.1.3 测定液的制备

试样溶液降至室温后，用盐酸溶液（11.2）调节pH至4.50，加入5mL硫酸锌溶液（11.3），充分混合。转入50mL容量瓶中，用水定容至刻度并充分混匀后，用滤纸过滤。滤液经0.45μm滤膜过滤后，即为试样待测液。

12.2 参考色谱条件：

色谱柱：ODS-C₁₈，250×4.6mm，5μm；或具有相同性能的色谱柱

流动相配制：0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液：甲醇=90:10

流速：1mL/min

测定波长：200nm

柱温：30℃

进样体积：10ul

12.3 测定

12.3.1 标准曲线测定

分别吸取泛酸标准中间液（11.5.2）1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0mL于100mL容量瓶中，加水定容至刻度，得到浓度分别为1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0μg/mL的泛酸标准工作液。

分别吸取10μL标准系列工作液，注入高效液相色谱仪中，得到相应的峰高（或峰面积）。以峰高（或峰面积）为纵坐标，以标准工作液浓度为横坐标绘制标准曲线。

12.3.2 试样溶液的测定

吸取试样待测液（13.1.3）10μL，注入高效液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积），由标准曲线中查得试液中泛酸的浓度。

13 结果计算和表示

试样中泛酸的含量 X ，以质量分数微克每百克（μg/100g）表示，按式（2）计算：

$$X = \frac{V \times C \times K}{m} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中：

C ——试样溶液中泛酸的质量浓度，μg/100g；

m ——称取试样的质量，g；

V ——被测样液总体积；

K ——样液稀释倍数。

注：计算结果表示到小数点后一位。

计算结果以两次独立测定结果的算术平均值表示。保留到小数点后一位。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录 A
(资料性附录)
泛酸标准与试样色谱图

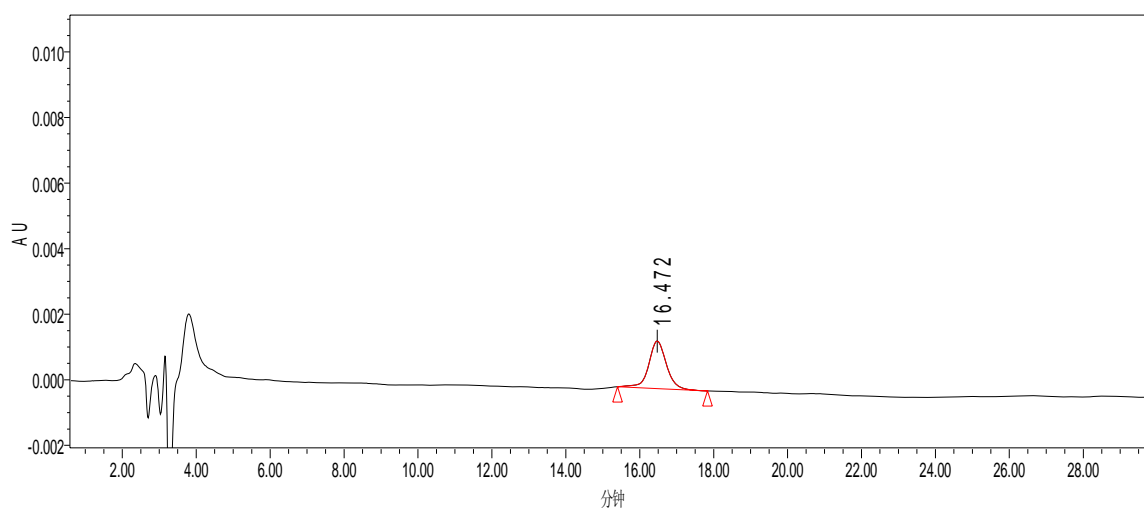


图 A.1 泛酸标准色谱图

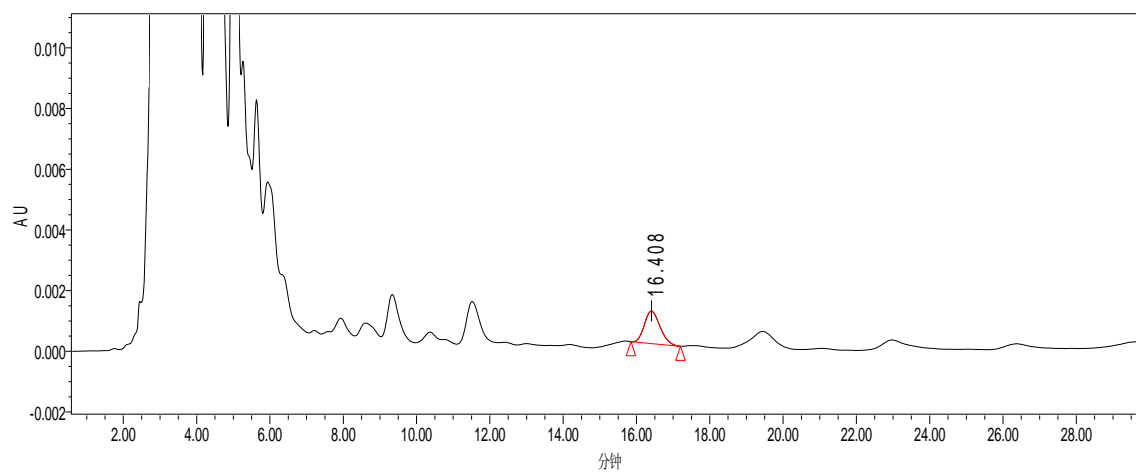


图 A.2 泛酸试样色谱图