

ICS 67.100.10

C



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.19—1997

婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定

Determination of free biotin content 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

本标准等同采用美国公职分析化学师协会（AOAC）方法。

本标准代替GB/T 5413.19—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 游离生物素的测定》。

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 5413.19-1997。

婴幼儿食品和乳品中 游离生物素的测定

1 范围

本标准规定了用微生物法测定游离生物素的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中游离生物素的测定。

2 方法提要

通过植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 生长情况来测定游离生物素含量。

3 试剂、菌种和培养基

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。

3.1 生物素:标准品。

3.2 乙醇:体积分数为 50%。

3.3 菌种:植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。

3.4 培养基

3.4.1 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, pH6.8±0.2 (25℃)。

3.4.2 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, pH6.8±0.2 (25℃)。

3.4.3 生物素测定用培养基:维生素测定用酪蛋白氨基酸 12g,葡萄糖 49g,乙酸钠 20g, L-胱氨酸 0.2g, DL-色氨酸 0.2g, 硫酸腺嘌呤 20mg, 盐酸鸟嘌呤 20mg, 尿嘧啶 20mg, 盐酸硫胺素 2mg, 核黄素 2mg, 烟酸 1mg, 泛酸钙 2mg, 盐酸吡哆醇 2mg, p-氨基苯甲酸 200 μg, 磷酸氢二钾 1g, 磷酸二氢钾 1g, 硫酸镁 0.4g, 氯化钠 20mg, 硫酸亚铁 20mg, 硫酸锰 20mg, 加蒸馏水至 1000mL, pH6.7±0.1 (25℃)。

4 仪器

常用微生物实验室仪器及 pH 计。

5 制备

5.1 菌种的制备

5.1.1 液体培养基的制备

吸取定量的基础液体培养基,加入等量的蒸馏水,每个培养管分装 10mL,盖上盖,121℃灭菌 15min,迅速将来菌管冷却,避免颜色形成。贮于冰箱中。

5.1.2 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 贮备管的制备

将所用的微生物菌种接种到 2 个以上琼脂培养基试管内,在 28~40℃之间选择一个恒定温度 (±0.5℃) 培养 6~24h,完成后放入冰箱。

在使用新的菌种用于一个测定时,要在 1~2 周内做几个继代转接。

不要用保存一周以上的培养基接种,培养基在保存过程中不要打开。

5. 1. 3 接种的准备

将植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) (3. 3) 转接到一个无菌的 10mL 液体培养基中, 得到一个菌悬液。

5. 2 标准溶液的制备

5. 2. 1 生物素标准贮备液: 浓度 50 μ g/mL。

精确称取 50~60mg 生物素标样 (3. 1) (从干燥器中), 用乙醇 (3. 2) 稀释, 得到 50 μ g/mL 的生物素溶液, 贮于冰箱中。

5. 2. 2 生物素标准工作液: 浓度 0. 1ng/mL。

吸 1mL 标准贮备液 (5. 2. 1), 用水稀释至 1000mL, 再分别吸此稀释溶液各 1mL, 一个稀释至 500mL, 作为高浓度标准溶液, 一个稀释至 1000mL, 作为低浓度标准溶液。每次现用现配。

5. 3 玻璃仪器的准备

使用焰状活性剂对硬玻璃测定管及其他必要的玻璃器皿进行清洗(月桂磺酸钠, 是一种合适的清洗剂) 检验微生物对少数生长因子和许多清洗剂具有很高的敏感性, 因此, 清洗之后要求在 250 $^{\circ}$ C 干热条件下, 加热 1~2h。

6 操作步骤

6. 1 样品的处理

6. 1. 1 干粉样品

精确称取一定量样品, 该样品应含 0. 2~0. 5mg 生物素。继续 6. 1. 3 步骤。

6. 1. 2 液体样品

吸一定量的液体样品, 该样品应含 0. 2~0. 5mg 生物素。继续 6. 1. 3 步骤。

6. 1. 3 样品的提取

加水, 使样品总体积为 150mL, 混合后, 用 1mol/L 盐酸调 pH 为 4. 5~4. 6, 定量转到 250mL 容量瓶中, 用水定容, 充分混合, 用滤纸过滤, 弃去最初的几毫升, 吸 5mL 滤液, 用水定容到 100mL。

6. 2 标准曲线的制备

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准溶液和维生素 B₁₂ 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 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 中加低浓度标准溶液; No. 8~10 中加高浓度标准溶液。

6. 3 测定液样品

按表 2 顺序加蒸馏水、样品溶液和维生素 B₁₂ 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. 4 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 $^{\circ}$ C 灭菌 10min。

6.5 接种

无菌地接种每个管，均加入一滴适当的接种物。除二组（或三组）中含有 0.0mL 标准溶液（未接种空白管）以外。盖上盖，充分振荡混合所有管。

6.6 培养

在 28~40℃ 之间选择一个恒定（±0.5℃），培养 60~72h。

6.7 测定（酸度法）

试管被任何外来微生物污染则测定无效。通过对每个试管的视觉检查，进行反应预测，未接种管是清的，标准溶液和样品中应无其他微生物生长。

6.7.1 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 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。

6.7.2 测 pH 值

试管被任何外来微生物污染则测定无效。通过对每个试管的视觉检查进行反应预测，未接种管是清的，标准溶液和样品中应无其他微生物生长。

在培养之后读出管内容物的 pH 值，近似到 0.01pH 值单位。

7 分析结果表述

$$\text{样品中生物素的含量} (\mu\text{g}/100\text{g 或 } \mu\text{g}/100\text{mL}) = \frac{X}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \dots\dots (1)$$

式中：X——每毫升测定溶液中生物素含量的平均值，mL；

F——稀释因子；

m——样品的质量或体积，g 或 mL。

8 允许差

同一样品两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 10%。