



中华人民共和国国家标准

GB 5413.17—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定

National food safety standard

Determination of pantothenic acid in foods for infants and young children,
milk and milk products

2010-03-26 发布

2010-06-01 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 Pantothenic Acid in Vitamin Preparations。

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 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。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413-1985、GB/T 5413.17-1997。

食品安全国家标准

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。
本标准适用于婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

第一法 微生物法

3 原理

利用植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 对泛酸的特异性，在含有泛酸样品中生长产生的酸度和形成的光密度来测定泛酸的含量。

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 g 氯化钠溶解于 1000 mL 水中，分装于具塞试管中，每管 10 mL，121 °C 灭菌 15 min。每周准备一次。

4.2 泛酸钙标准品。

4.3 乙酸溶液（0.2 mol/L）：吸取 12 mL 冰乙酸用水稀释至 1000 mL。

4.4 甲苯（C₇H₈）。

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

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 15 g，酵母浸膏 5 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，琼脂 10 g，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2（20 °C ~ 25 °C）。

4.7.2 乳酸杆菌肉汤培养基：光解脲 15 g，酵母浸膏 5 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2（20 °C ~ 25 °C）。

4.7.3 泛酸测定用培养基：葡萄糖 40 g，乙酸钠 20 g，无维生素酸水解酪蛋白 10 g，磷酸氢二钾 1 g，磷酸二氢钾 1 g，L-胱氨酸 0.4 g，L-色氨酸 0.1 g，硫酸镁 0.4 g，氯化钠 20 mg，硫酸亚铁 20 mg，硫酸锰 20 mg，硫酸腺嘌呤 20 mg，盐酸鸟嘌呤 20 mg，尿嘧啶 20 mg，胡萝卜素 400 μg，盐酸硫胺素 200 μg，

生物素 0.8 μg ，p-氨基苯甲酸 200 μg ，烟酸 1 mg，盐酸吡哆醇 800 μg ，聚山梨糖单油酸酯 0.1 g，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.7 ± 0.1 ($20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

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

4.9 盐酸 (0.1 mol/L)：吸取 8.3 mL 盐酸，用水稀释至 1000 mL。

4.10 标准溶液

4.10.1 泛酸标准贮备液 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：精确称取 45 mg~55 mg 泛酸钙标准品 (4.2)，溶于 500 mL 蒸馏水中，加 10 mL 乙酸溶液 (4.3)，加 100 mL 乙酸钠溶液 (4.5)，用水稀释至泛酸钙精确浓度为 43.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (即泛酸浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，加 0.5 mL 甲苯 (4.4) 贮于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，保存期为 4 个月。

4.10.2 泛酸中间贮备液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：取 25 mL 标准贮备液 (4.10.1)，加入蒸馏水 500 mL，乙酸溶液 10 mL (4.3)，乙酸钠溶液 100 mL (4.5)，再用水稀释至 1 L。加 0.5 mL 甲苯 (4.4) 贮于冰箱中 ($2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)，保存期为 1 个月。

4.10.3 泛酸标准工作液 (10 ng/mL, 5 ng/mL)：吸两次 5.0 mL 中间贮备液 (4.10.2)，分别用水定容至 500 mL 和 1000 mL，临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 分光光度仪。

5.2 pH 计：精度为 0.01。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 天平：感量 0.1 mg。

5.5 生化培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.6 离心机：转速 ≥ 2000 转/分钟。

6 分析步骤

6.1 测试菌液的制备

6.1.1 把植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ATCC 8014 冻干菌粉转入乳酸杆菌肉汤培养基 (4.7.2) 试管中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。再转接至乳酸杆菌琼脂培养基 (4.7.1) 试管中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。培养好的乳酸杆菌琼脂培养基 (4.7.1) 试管的培养物作为贮备菌种。

6.1.2 从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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。每月转接一次，作为月接种管贮于冰箱中。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

6.1.3 从月接种的培养管中的一支再接种一支乳酸杆菌琼脂培养基 (4.7.1) 试管， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，作为日接种管每日测定用。

6.1.4 从日接种管中接种一管乳酸杆菌肉汤培养基 (4.7.2)， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。在无菌条件下离心该培养液 10 min (2000 转/分钟)，弃去上清液。用 10 mL 生理盐水 (4.1) 振荡洗涤菌体，离心 10 min (2000 转/分钟)，弃去上清液，用 10 mL 生理盐水 (4.1) 振荡清洗。如前离心操作，弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水 (4.1)，混匀。吸 1 mL 该菌悬液于 10 mL 生理盐水 (4.1) 中，混匀制成测试菌液。

6.1.5 以生理盐水(4.1)做对照,在分光光度计 550 nm 波长下,测测试菌液(6.1.4)的光密度值,此值应在 60%~80%之间。

6.2 试样的处理

称取 2 g (精确至 0.0001 g) 固态试样或 5 g (精确至 0.0001 g) 液态试样(约含泛酸 0.1 mg)于 250 mL 三角烧杯中。加入 10 mL Tris 缓冲液(4.8),再加入少量水,121 °C 水解 15 min,冷却。用盐酸(4.9)调 pH 至 4.5 ± 0.2 ,转入 250 mL 容量瓶中用水定容。过滤,吸 4 mL 滤液,稀释至泛酸的浓度约为 5 ng/mL。

6.3 标准曲线的制作

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准溶液和培养基于试管中,表 1 中每一编号需制作 3 管。试管 S2 至 S10 中,相当泛酸含量为 0 ng、5 ng、10 ng、15 ng、20 ng、25 ng、30 ng、40 ng、50 ng。

表 1 标准曲线管制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
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
注 1: 试管 S3~S7 中加低浓度的为标准溶液。										
注 2: 试管 S8~S10 中加高浓度的为标准溶液。										

6.4 试样管的制作

按表 2 顺序加入蒸馏水、试样和培养基于试管中,一式三份。

表 2 试样管的制作

试管号	1	2	3	4
蒸馏水 (mL)	4	3	2	1
试样 (mL)	1	2	3	4
培养基 (mL)	5	5	5	5

6.5 灭菌

将标准曲线管和试样管 121 °C 灭菌 5 min,迅速冷却到室温(商品化培养基按标签说明进行灭菌)。

注: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。

6.6 接种

在无菌条件下每管中均加入一滴(约 50 μ L)测试菌液(6.1.4),加盖,充分振荡混匀所有试管(标准曲线未接种空白管 S1 除外)。

6.7 培养

36 °C \pm 0.5 °C 培养 16 h~24 h。对每个试管进行目测检查,未接种管中培养液应是澄清的,标准曲线管和试样管中培养液的浊度应有梯度。未接种管中若出现混浊,则测定无效。

6.8 测定

以接种空白管(表1中试管号S2)做对照,取出最高浓度标准曲线管S7,振荡5s,在波长550nm条件下读取光密度值,放回重新培养。2h后同等条件重新测该管的光密度,如果两次光密度的绝对差结果 $\leq 2\%$,则取出全部检验管测定标准溶液和试样的光密度。

6.9 标准曲线的绘制

以标准曲线管泛酸含量作横坐标,以光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

6.10 试样管中泛酸含量的计算

按照6.8每个试样管测定的光密度值,从标准曲线中查得对应的泛酸含量。每一编号的三个试样管应计算管中每毫升测定液泛酸的含量,并与三者平均值相比较。相对偏差小于15%的试管为有效试管,无效试管管应舍去。有效试管总数应大于所有试样管总数的2/3。重新计算每一编号的有效试管管中每毫升测定液泛酸含量的平均值,以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x 。

注:样品管中泛酸含量低于5ng,高于50ng的值应舍去。

7 分析结果的表述

试样中泛酸含量按式(1)计算:

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

式中:

X——试样中泛酸含量,单位为微克每百克($\mu\text{g}/100\text{g}$);

C_x ——6.10中计算所得的总平均值,单位为微克(μg);

f ——稀释倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g)。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

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 C_{18} 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规定的一级水。

10.1 淀粉酶:酶活力 $\geq 1.5\text{ U}/\text{mg}$ 。

10.2 甲醇(CH_3O):色谱纯。

10.3 盐酸。

10.4 硫酸锌(ZnSO_4)。

10.5 盐酸 (0.1 mol/L)：移取 8.3 mL 盐酸 (10.3) 于 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

10.6 硫酸锌溶液 (15 g/100mL)：称取 15 g 硫酸锌 (10.4) 用水溶解并定容至 100 mL。

10.7 磷酸二氢钾溶液 (0.05 mol/L)：称取 6.8 g 磷酸二氢钾，用水溶解并定容至 1000 mL。用磷酸调节 pH 至 3.0，用 0.45 μm 滤膜过滤。

10.8 泛酸标准溶液

10.8.1 泛酸标准储备液 (1 mg/mL)：准确称取泛酸钙 1.087 g，加水溶解并定容至 1000 mL。

泛酸浓度=泛酸钙浓度×0.920

10.8.2 泛酸标准中间液 (0.1 mg/mL)：吸取标准储备液 (10.8.1) 10 mL 于 100 mL 容量瓶中，加水定容。临用前配制。

11 仪器和设备

11.1 天平：感量为 0.1 mg。

11.2 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

11.3 超声波。

11.4 pH 计：精度为 0.01。

11.5 培养箱：55 °C ± 2 °C。

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 5 g (精确至 0.0001 g) 或液态试样约 20 g (精确至 0.0001 g) 于 150 mL 三角瓶中，固体试样加入约 30 mL 40 °C ~ 50 °C 温水，振摇溶解后超声萃取 20 min。

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 5 g (精确到 0.0001 g) 或液态试样约 20 g (精确到 0.0001 g) 于 150 mL 三角瓶中，加入淀粉酶 (10.1) 约 0.2 g，固体试样加入约 30 mL 40 °C ~ 50 °C 温水振摇溶解，盖上瓶塞，在 50 °C ~ 60 °C 条件下酶解 30 min。

12.2 测定液的制备

试样溶液降至室温后，用盐酸 (10.5) 调节 pH 至 4.5 ± 0.1，加入 5 mL 硫酸锌溶液 (10.6)，充分混合。转入 50 mL 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 0.45 μm 滤膜过滤后，即为试样待测液。

12.3 参考色谱条件

色谱柱：ODS-C₁₈ (粒径 5 μm，250 mm×4.6 mm) 或具有同等性能的色谱柱。

流动相：取磷酸二氢钾溶液 (10.7) 900 mL，取甲醇 (10.2) 100 mL，混匀后经 0.45 μm 微孔滤膜加压过滤。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：200 nm。

柱温：30℃±1℃。

进样量：10 μL。

12.4 测定

12.4.1 标准曲线测定

分别准确吸取泛酸标准中间液（10.8.2）1.0 mL，2.0 mL，4.0 mL，8.0 mL，12.0 mL于100 mL容量瓶中，加水定容至刻度，得到浓度分别为1.0 μg/mL，2.0 μg/mL，4.0 μg/mL，8.0 μg/mL，12.0 μg/mL的泛酸标准工作液，临用前配制。

将上述泛酸标准工作依次进行色谱测定（其标准样品色谱图见附录A中图A.1），记录色谱峰高（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。

12.4.2 试样溶液的测定

吸取试样待测液（12.2）10 μL，将试样待测液进行色谱测定，从标准曲线中查得试液中泛酸的浓度。

13 分析结果的表述

试样中泛酸的含量按式（2）计算：

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

式中：

X——试样中泛酸含量，单位为微克每百克（μg/100 g）

C——试样溶液中泛酸的质量浓度，单位为微克毫升（μg/mL）；

m——称取试样的质量，单位为克（g）；

V——被测样液总体积，单位为毫升（mL）；

K——样液稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

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%。

15 其他

本标准第二法检出限为 100 μg/100 g。

附录 A
(资料性附录)
泛酸标准溶液的液相色谱图

A.1 泛酸标准溶液的液相色谱图

泛酸标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

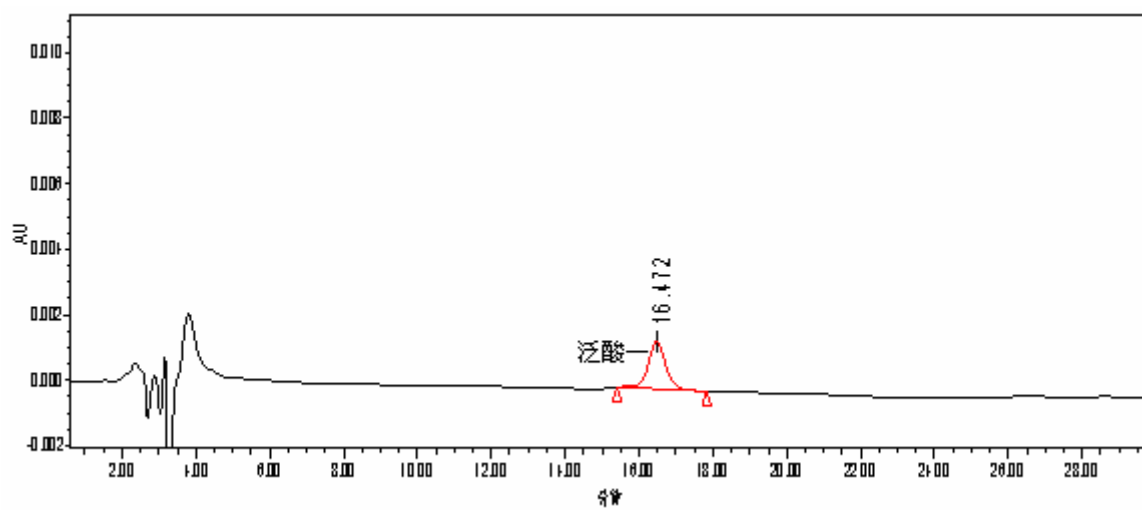


图 A.1 泛酸标准溶液的液相色谱图