



中华人民共和国国家标准

GB 5413.16—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性） 的测定

National food safety standard

Determination of folic acid (folate activity) 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：

——对磷酸盐缓冲液作了调整；

——增加了米粉的处理方法；

——增加了光密度法测定步骤。

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。

食品安全国家标准

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。

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。

3 原理

利用干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）ATCC 7469 对叶酸的特异性，在含有叶酸的样品中生长产生的酸度和形成的光密度来测定叶酸的含量。

4 试剂和材料

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

4.1 鸡胰腺：称取 100 mg 干燥的鸡胰腺，加 20 mL 蒸馏水，搅拌 15 min，离心 10 min（3000 转/分钟），取上清液，临用前配制。

4.2 0.9%生理盐水：称取 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℃ 灭菌 15 min。每周准备一次。

4.3 磷酸盐缓冲液

4.3.1 磷酸盐缓冲液 I（0.05 mol/L）：称取 5.85 g 磷酸二氢钾，1.22 g 磷酸氢二钾，用 1000 mL 水溶解。临用前按 0.5 g/100 mL 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 14.2 g 磷酸氢二钠，用 1000 mL 水溶解。临用前按 1.0 g/100 mL 加入抗坏血酸，用氢氧化钠溶液 A（4.16）调 pH 至 7.8±0.1。

4.3.3 磷酸盐缓冲液 III（用于谷物及谷物制品测试）：称取 14.2 g 磷酸氢二钠，用 1000 mL 水溶解。临用前按 1.0 g/100 mL 加入抗坏血酸，用氢氧化钠溶液 A（4.16）调 pH 至 6.8±0.1。

4.3.4 磷酸盐缓冲液 IV（0.1 mol/L）（用于谷物及谷物制品标准溶液制备）：溶解 13.61 g 磷酸二氢钾于水中稀释到 1000 mL。用氢氧化钾溶液（4.10）调 pH 至 7.0±0.1。

4.4 叶酸标准品。

4.5 氨水（10.8%）。

4.6 甲苯（C₇H₈）。

4.7 抗坏血酸（C₆H₈O₆）。

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 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 ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15min，备用。

4.9.2 乳酸杆菌肉汤培养基：胨化乳 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 ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15min，备用。

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

注：市售商业化合成培养基效果更稳定。

4.10 氢氧化钾溶液 (4 mol/L)：称取 224 g 氢氧化钾于 1000 mL 烧杯中，用 400 mL 水溶解，冷却至室温后，转移至 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

4.11 木瓜蛋白酶溶液：1 g 蛋白酶 (活力 $\geq 6000\text{ U/mg}$, pH 6.0 ± 0.1 , $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) 溶于 100 mL 磷酸盐缓冲液 I (4.3.1) 中。临用前配制。

4.12 α -淀粉酶溶液：1 g α -淀粉酶 (1.5 U/mg) 溶于 100 mL 磷酸盐缓冲液 I (4.3.1) 中。临用前配制。

4.13 0.22 μm 灭菌滤膜。

4.14 标准溶液的制备

4.14.1 叶酸标准贮备液 (500 $\mu\text{g/mL}$)：称取 55 mg~56 mg (精确至 0.1 mg) 叶酸标准品 (4.4)，用 50 mL 蒸馏水转入 100 mL 容量瓶中，加 2 mL 氨水 (4.5)。溶液制备后，按式 (1) 计算溶液的体积，要求贮备液中叶酸盐的浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ ：

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

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

式中：

m ——叶酸标准品的质量，单位为毫克 (mg)；

c ——叶酸标准品的纯度，单位为克每百克 (g/100 g)。

用水稀释溶液至刻度，用吸管加水至计算要求的体积，充分混合，放入棕色试剂瓶中 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏，保存期为 4 个月。

4.14.2 叶酸标准中间液 (50 $\mu\text{g/mL}$)：吸取 10 mL 叶酸标准贮备液 (4.14.1) 于 100 mL 棕色容量瓶中，用水定容至刻度，充分混匀， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏，保存期为 1 个月。

4.14.3 叶酸标准工作液 (0.05 ng/mL, 0.1 ng/mL)：吸取 1 mL 叶酸标准中间液 (4.14.2) 于 100 mL 棕色容量瓶中，用水定容至刻度，混合。再吸该液 1 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，定容，混合。从上液中分别吸取 5 mL 于 250 mL 和 500 mL 棕色容量瓶中，用磷酸盐缓冲液 I (4.3.1) 定容到刻度，混匀，即为高浓度标准工作液 (0.1 ng/mL) 和低浓度标准工作液 (0.05 ng/mL)。临用前配制。

4.15 盐酸 (1 mol/L)：量取 83.0 mL 盐酸溶于水中，冷却后定容至 1000 mL。

4.16 氢氧化钠溶液 A (4 mol/L)：称取 160 g 氢氧化钠于 1000 mL 烧杯中，用 400 mL 水溶解，冷却至室温后，转移至 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

4.17 氢氧化钠溶液 B (0.1 mol/L)：吸取 2.5 mL 氢氧化钠溶液 A (4.16) 转移至 100 mL 容量瓶中用水定容。

4.18 氢氧化钠标准滴定溶液 (0.1 mol/L ± 0.0002 mol/L)：称取 4 g (精确至 0.0001 g) 氢氧化钠用水稀释至 1000 mL，用邻苯二甲酸氢钾标定。保存此溶液的容器要密封，以防二氧化碳渗入。

4.18.1 氢氧化钠标准溶液的标定：称取约 0.18 g (精确至 0.0001 g) 于 105 °C ~ 110 °C 烘至恒重的邻苯二甲酸氢钾，用 50 mL 除二氧化碳的水溶于锥形瓶中，加两滴 5 g/L 的酚酞指示剂，用配好的氢氧化钠溶液滴定至粉红色，同时作空白实验。按式 (2) 计算氢氧化钠标准溶液的浓度：

$$c = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.2042} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

c ——氢氧化钠的浓度，单位为摩尔每升 (mol/L)；

m ——称取的邻苯二甲酸氢钾的质量，单位为克 (g)；

V_1 ——氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——空白试验氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升 (mL)。

4.18.2 酚酞溶液：取 0.5 g 酚酞溶于 75 mL 体积分数为 95 % 的乙醇中，加入 20 mL 水，再加入氢氧化钠溶液 (4.18)，直至加入一滴立即变成粉红色，再用水定容至 100 mL。

4.19 溴麝香草酚蓝指示剂：称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于研钵中，加入 1.6 mL 氢氧化钠溶液 B (4.17) 研磨，加少许水至完全溶解，转移至 250 mL 容量瓶中用水定容。

5 仪器和设备

5.1 pH 计：精度为 0.01。

5.2 离心机：转速 ≥ 2000 转/分钟。

5.3 分光光度仪。

5.4 天平：感量为 0.1 mg。

5.5 生化培养箱：36 °C ± 1 °C

5.6 滴定管：分刻度值为 0.1 mL。

5.7 涡旋振荡器。

6 分析步骤

6.1 测试菌液的制备

6.1.1 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) ATCC 7469 冻干菌粉转入乳酸杆菌肉汤培养基 (4.9.2) 中，36 °C ± 1 °C 培养 24 h 后，转接至乳酸杆菌琼脂培养基 (4.9.1) 试管中，再 36 °C ± 1 °C 培养 24 h。培养好的乳酸杆菌琼脂培养基 (4.9.1) 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(4.9.1)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(4.9.1)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(4.9.2), $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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(4.2)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(4.2)振荡清洗。如前离心操作,弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水(4.2),混匀。吸 1 mL 该菌悬液于 10 mL 生理盐水(4.2)中,混匀制成测试菌液。

6.1.5 以生理盐水(4.2)做对照,用分光光度计,于 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 试样的制备

6.2.1 乳制品

称取 2 g (精确至 0.0001 g) 试样(约含叶酸 $5\text{ }\mu\text{g}$) 于 100 mL 烧杯中,用 25 mL~30 mL 水复原样品,转入 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,溶液中叶酸的质量浓度大约为 $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。吸取 1 mL 该样液和 1 mL 鸡胰腺(4.1)于一个 180 mm×15 mm 的带螺旋盖的试管中,充分混合。加 18 mL 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 I (4.3.1),再加 1 mL 甲苯(4.6)。同时制备±空白对照管,吸 1 mL 蒸馏水和 1 mL 鸡胰腺(4.1)于空白管中,加 18 mL 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 I (4.3.1) 及 1 mL 甲苯(4.6)。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,样品管和空白管保温 16 h 后,于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min。用磷酸盐缓冲液 I (4.3.1) 作适当稀释,得到浓度约为 0.1 ng/mL 的叶酸盐溶液。

若确定样品中强化叶酸与原生叶酸相比所占比例很大,则可以用 1 mL 样液加 19 mL 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 I (4.3.1) 于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min,再用磷酸盐缓冲液 I (4.3.1) 稀释,得到浓度约为 0.1 ng/mL 的叶酸盐溶液。

6.2.2 谷物及谷物制品

称取大约含 $1\text{ }\mu\text{g}$ 叶酸的试样于 150 mL 三角烧瓶中。加 20 mL pH 7.8 磷酸缓冲溶液 II (4.3.2),混匀后加 50 mL 水和 1.0 mL 甲苯(4.6)。加盖后 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min 灭菌,然后迅速冷却。加 1 mL 木瓜蛋白酶溶液(4.11),于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 3h 后 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min,冷却。加 1 mL α -淀粉酶溶液(4.12), $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h 后加 4 mL 鸡胰腺(4.1),加盖, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 16 h 后 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min,冷却。用 1 mol/L 盐酸(4.15)调 pH 至 4.5,用水稀释定容到 100 mL。过滤得到澄清滤液,然后吸取 1 mL 澄清滤液用磷酸盐缓冲液 III (4.3.3) 定容至 100 mL,得到浓度约为 0.1 ng/mL 的叶酸盐溶液。

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 20 mL 0.05 mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液 II (4.3.2) 和 50 mL 水,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min,然后吸取 1 mL 澄清滤液,再用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 III (4.3.3) 稀释,得到浓度约为 0.1 ng/mL 的叶酸盐溶液。

6.3 标准曲线管的制作

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准工作液(4.14.3)(测定谷物及谷物制品的标准溶液用磷酸盐缓冲液 IV (4.3.4) 代替磷酸盐缓冲液 I (4.3.1)) 和叶酸测定用培养基(4.9.3)于培养管中。表 1 中每一编号需制作 3 管。试管 S2 至 S10 中,相当叶酸含量为 0.00 ng 、 0.05 ng 、 0.10 ng 、 0.15 ng 、 0.20 ng 、 0.25 ng 、 0.30 ng 、 0.40 ng 、 0.50 ng 。

表 1 标准曲线管的制作

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 中加低浓度标准工作液。
注 2: 试管 S8~S10 中加高浓度标准工作液。

6.4 试样管的制作

按表 2 顺序加入蒸馏水、试样和叶酸测定用培养基于试管中，表中每一编号需制作 3 管。

表 2 试样管的制作

试管号	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

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

无菌条件下每管中均加入一滴（约 50 μL）菌悬液（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

6.7.1 酸度法：36 °C ± 1 °C 培养 72 h。对每支试管进行目测检查，未接种管内培养液应是澄清的，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。

6.7.2 光密度法：在 36 °C ± 1 °C，培养 16 h~24 h。其他同 6.7.1。

6.8 测定

6.8.1 酸度法

6.8.1.1 用 10 mL 水将未接种空白管 S1 和接种空白管 S2 的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（4.19）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（4.18）滴定标准曲线未接种空白管 S1 和接种空白管 S2。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

注：如果接种空白滴定反应消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积数等于或高于未接种空白水平的 1.5 mL，则测定结果无效。

6.8.1.2 用 10 mL 水将标准曲线管和试样管中的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（4.19）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（4.18.1）滴定标准曲线管和试样管的培养物。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

注：通常标准曲线管 S7 消耗的 0.1 mol/L 的氢氧化钠标准滴定溶液体积数在 8 mL~12 mL 之间。

6.8.2 光密度法

以接种空白管（表1中试管号S2）作对照，取出最高浓度标准曲线管S7，振荡5s，在波长550nm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≤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

以标准曲线管叶酸含量作横坐标，以消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数或光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

6.10 试样管中叶酸含量的计算

按照13.8每个试样管测定的消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数或光密度值，从标准曲线中查得对应的叶酸含量。每一编号的三个试样管应计算管中每毫升测定液叶酸的含量，并与其平均值相比较。相对偏差小于15%的试管为有效试管，无效试样管应舍去，有效试样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样管中每毫升测定液叶酸含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x 。

注：样品管中叶酸含量低于0.05ng，高于0.5ng的值应舍去。

7 分析结果的表述

试样中叶酸含量按式(3)计算：

$$X = [(C_x \times D) - EB] \times \frac{100}{1000m} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X ——试样中叶酸含量，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，单位为纳克（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，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

m ——样品的质量或体积，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试结果的绝对差值不超过算术平均值的10%。

9 其他

本标准检出限为 $2\mu\text{g}/100\text{g}$ 。