



中华人民共和国国家标准

GB 5413.19—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定

National food safety standard

Determination of free biotin 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 5413.19-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 游离生物素的测定》。

本标准附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.19-1997。

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定。

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

利用植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）对游离生物素的特异性和灵敏性，定量测定出试样中待测物质的含量。在含有除待测物质以外所有营养成分的培养基中，微生物的生长与待测物质含量呈线性关系，根据透光率与标准工作曲线进行比较，即可计算出试样中待测物质的含量。

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

4.2 生物素（d-Biotin 或 Vitamin H）标准品（ $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ ）：纯度 $\geq 99\%$ 。

4.3 培养基

4.3.1 乳酸杆菌琼脂培养基：见附录 A。

4.3.2 乳酸杆菌肉汤培养基：见附录 A。

4.3.3 生物素测定用培养基：见附录 A。

注：一些商品化合成培养基效果良好，商品化合成培养基按标签说明进行配制。

4.4 乙醇溶液（50%）。

4.5 硫酸溶液（3%）：量取 3mL 硫酸加入到水中，定容至 100 mL。

4.6 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L）：称取 20 g 氢氧化钠溶于 1000 mL 水中。

4.7 氯化钠溶液（9 g/L）：称取 9.0 g 氯化钠溶解于 1000 mL 水中，分装试管，每管 10 mL。121℃灭菌 15 min。

4.8 标准溶液的制备

4.8.1 生物素标准贮备液（100 $\mu\text{g/mL}$ ）：称取生物素标准品（4.2）用乙醇溶液（4.4）定容至生物素浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，贮于冰箱中。

4.8.2 生物素标准中间液（1 $\mu\text{g/mL}$ ）：吸取 1 mL 生物素标准贮备液（4.8.1），用乙醇溶液（4.4）定容至 100 mL。

4.8.3 生物素标准工作液（10 ng/mL ）：吸取 1 mL 生物素标准中间液（4.8.2），用乙醇溶液（4.4）定容至 100 mL。

4.8.4 标准曲线工作液

分两个浓度，高浓度溶液的浓度为 0.2 ng/mL；低浓度溶液的浓度为 0.1 ng/mL。从工作液中（4.8.3）吸取两次各 5 mL，用水分别定容到 250 mL 和 500 mL。

注：所有标准溶液要储存于冰箱内。4.8.1、4.8.2、和 4.8.3 保存期三个月，4.8.4 临用前配制。

5 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 5.1 天平：感量为 0.1 mg。
- 5.2 pH 计：精度 ≤ 0.02 。
- 5.3 分光光度计。
- 5.4 涡旋混合器。
- 5.5 离心机：转速 ≥ 2000 转/分钟。
- 5.6 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。
- 5.7 冰箱：2 °C \sim 5 °C。
- 5.8 无菌吸管：10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器或吸头。
- 5.9 瓶口分液器：0 mL \sim 10 mL。
- 5.10 锥形瓶：200 mL。
- 5.11 容量瓶（A 类）：100 mL，250 mL，500 mL。
- 5.12 单刻度移液管（A 类）：容量 5 mL。
- 5.13 漏斗：直径 90 mm。
- 5.14 定量滤纸：直径 90 mm。
- 5.15 试管：18mm \times 180 mm。

注：玻璃仪器使用前，用活性剂（月桂磺酸钠或家用洗涤剂加入到洗涤用水中即可）对硬玻璃测定管及其他必要的玻璃器皿进行清洗，清洗之后在 200 °C 干热 2 h。

6 分析步骤

6.1 接种菌悬液的制备

6.1.1 将冻干菌株（4.1）活化后，转接到乳酸杆菌琼脂培养基（4.3.1）中，36 °C ± 1 °C 培养过夜。再转接 2 \sim 3 代来增强活力。然后再将其从固体培养上转接到乳酸杆菌肉汤培养基（4.3.2）中培养。

6.1.2 将乳酸杆菌肉汤中的培养液以 2000 转/分钟离心 2 min \sim 3 min，倾出上清液，加入 10 mL 氯化钠溶液（4.7），混匀，再离心 2 min \sim 3 min，如此清洗 3 次 \sim 4 次，吸适量该菌悬液于 10 mL 氯化钠（4.7）中，待测。

6.1.3 用分光光度计以氯化钠溶液（4.7）做空白，于 550 nm 波长下测菌悬液（6.1.2）的透光率，使其透光率在 60 % \sim 80 % 之间。

6.2 样品的处理

6.2.1 干粉样品

称取一定量样品（精确至 0.0001 g）于 250 mL 三角瓶中，该样品应含 0.2 μ g \sim 0.5 μ g 生物素。继续 6.2.3 步骤。

6.2.2 液体样品

吸一定量的液体样品于 250 mL 三角瓶中，该样品应含 0.2 μ g \sim 0.5 μ g 生物素。继续 6.2.3 步骤。

6.2.3 样品的提取

加入硫酸溶液(4.5) 100 mL, 121 °C水解 30 min, 冷却后用氢氧化钠溶液(4.6)调节 pH 至 4.5±0.2, 定量转到 250 mL 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。吸取滤液 5 mL, 加入约 20 mL 水, 用氢氧化钠溶液(4.6)调 pH 为 6.8±0.2, 定量转到 100 mL 容量瓶中, 用水定容。

6.3 标准曲线的制作

按表 1 顺序加入水、标准曲线工作液(4.8.4)和生物素测定用培养基(4.3.3)于培养管中, 一式三份。

表1 标准曲线的制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
水 (mL)	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
标准曲线工作液 0.1 ng/mL (mL)	0	0	1	2	3	4	5	0	0	0
标准曲线工作液 0.2 ng/mL (mL)	0	0	0	0	0	0	0	3	4	5
培养基 (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

6.4 待测液的制作

按表 2 顺序加水、样品溶液(6.2.3)和生物素测定用培养基(4.3.3)于培养管内, 一式三份。每份样品需带样品空白试管一只, 管内分别加入 5 mL 待测液和 5 mL 培养基。

表2 待测液的制作

试管号	1	2	3	4	样品空白
水 (mL)	4	3	2	1	0
样品溶液 (mL)	1	2	3	4	5
培养基 (mL)	5	5	5	5	5

6.5 灭菌

将6.3和6.4中所有的试管盖上试管帽, 放入灭菌釜内, 121 °C灭菌 5 min (商品培养基按标签说明进行灭菌)。

6.6 接种

从灭菌釜内取出试管, 将试管迅速冷却至 30 °C 以下。将接种菌悬液(6.1.2)用滴管或移液器向上述试管中各滴加一滴(约 50 μL), 其中标准曲线管中未接种空白 S1 和样品空白除外。

6.7 培养

将试管放入培养箱内, 36 °C ±1 °C 培养 19 h~20 h。

6.8 测定

对每支试管进行视觉检查, 接种空白试管 S1 内培养液应是澄清的, 如果出现浑浊, 则结果无效。

6.8.1 以接种空白试管 S1 做对照, 测定最高浓度标准曲线试管的吸光度, 两小时后重新测定。两次结果透光率差值若小于 2%, 则取出全部检验管测其吸光度 A。

6.8.2 以接种空白试管 S2 为空白, 调节吸光度为 0, 依次读出其他每支试管的吸光度 A, 样品空白的吸光度 A 一并读出。

6.8.3 用涡旋混合器充分混合每一支试管(也可以加一滴消泡剂)后, 立即将培养液移入比色皿内进行测定, 波长为 550 nm, 待读数稳定 30 s 后, 读出吸光度 A, 每支试管稳定时间要相同。以生物素标准品的含量为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标作标准曲线。

6.8.4 待测液培养试管中, 样品空白试管吸光度应小于 0.05。若样品空白试管吸光度大于 0.02, 加入待测液 1 mL 的试管的吸光度值要减去其样品空白试管吸光度值的 1/5, 加入待测液 2 mL 的试管的吸光

度值要减去其样品空白试管吸光度值的 2/5，以此类推，作为计算结果的依据。根据待测液的吸光度 A ，从标准曲线中查得该待测液中生物素的浓度，再根据稀释因子和称样量计算出试样中生物素的含量。吸光度值超出标准曲线管 S3~S10 范围的试样管要舍去。

6.8.5 对每个编号的待测液试管，用每支试管的吸光度值计算每毫升该编号待测液生物素的含量，并计算该编号待测液生物素含量平均值，每支试管测得的该浓度不得超过该平均值的 $\pm 15\%$ ，超过者要舍去。如果符合该要求的管数少于所有四个编号待测液总管数的 2/3，需要重新检验。如果符合该要求的管数大于等于原来管数的 2/3，重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液生物素含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x ，用于计算试样中的生物素含量。

7 分析结果的表述

试样中生物素的含量按公式 (1) 计算：

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

式中：

X ——试样中生物素的含量，单位为微克每百克 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)；

C_x ——6.8.5 中计算所得的总平均值，单位为纳克 (ng)；

m ——试样的质量，单位为克 (g)；

f ——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，结果保留两位有效数字。

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%。

9 其他

本标准检出限为 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 乳酸杆菌琼脂培养基

A.1.1 成分

胨化乳 15.0 g, 酵母浸膏 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 番茄汁 100 mL, 磷酸二氢钾 2.0 g, 聚山梨糖单油酸酯 1.0 g, 加水至 1000 mL, 调节 pH 至 6.8 ± 0.2 ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

A.1.2 制法

在 A.1.1 中加入 10.0 g 琼脂, 加热煮沸, 使琼脂溶化。混合均匀后分装试管, 每管 10 mL。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 备用。

A.2 乳酸杆菌肉汤培养基

A.2.1 成分

胨化乳 15.0 g, 酵母浸膏 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 番茄汁 100 mL, 磷酸二氢钾 2.0 g, 聚山梨糖单油酸酯 1.0 g, 加水至 1000 mL, 调节 pH 至 6.8 ± 0.2 ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

A.2.2 制法

将 A.2.1 成分加热煮沸, 混合均匀后分装试管, 每管 10 mL。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.3 生物素测定用培养基

A.3.1 成分

维生素测定用酪蛋白氨基酸 12.0 g, 葡萄糖 40.0 g, 乙酸钠 20.0 g, L-胱氨酸 0.2 g, DL-色氨酸 0.2 g, 硫酸腺嘌呤 20.0 mg, 盐酸鸟嘌呤 20.0 mg, 尿嘧啶 20.0 mg, 盐酸硫胺素 2.0 mg, 核黄素 2.0 mg, 烟酸 2.0 mg, 泛酸钙 2.0 mg, 盐酸吡哆醇 4.0 mg, p-氨基苯甲酸 200.0 μg , 磷酸氢二钾 1.0 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 硫酸镁 0.4 g, 氯化钠 20.0 mg, 硫酸亚铁 20.0 mg, 硫酸锰 20.0 mg, 加水至 1000 mL, pH 6.8 ± 0.2 ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

A.3.2 制法

将上述成分溶解于水中, 调节 pH, 备用。
