



中华人民共和国国家标准

GB 5413.25—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定

National food safety standard

Determination of inositol 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 5413.25-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 肌醇的测定》。

本标准与GB/T 5413.25-1997相比，第一法主要变化如下：

- 对菌种保藏培养基进行了纠正；
- 试样处理由盐酸蒸馏法改为盐酸高压水解法；
- 菌种接种方式由菌液与培养基混合后分装试管改为菌液向试管中滴加法；
- 对标准工作溶液的浓度做了调整；
- 灭菌温度由100℃调整为121℃；
- 明确了控制接种菌悬液浓度的要求和方法；
- 提高了计算公式的适用性；
- 增加了检出限。

第二法主要变化如下：

- 采用肌醇硅烷化衍生法；
- 增加了检出限。

本标准的附录A和附录B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 5413.25-1997。

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定。

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

利用葡萄汁酵母菌（*Saccharomyces uvarum*）对肌醇的特异性和灵敏性，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：葡萄汁酵母菌（*Saccharomyces uvarum*），ATCC 9080。

4.2 肌醇（myo-Inositol）标准品：分子式 $C_6H_{12}O_6$ ，纯度 $\geq 99\%$ 。

4.3 氯化钠（NaCl）。

4.4 氢氧化钠（NaOH）。

4.5 培养基

4.5.1 麦芽浸粉琼脂培养基（Malt Extract Agar）：参见附录 A。

4.5.2 肌醇测定培养基：参见附录 A。

4.6 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。

4.7 盐酸（1 mol/L）：量取 82.0 mL 盐酸溶于水中，冷却后定容至 1000 mL。

4.8 盐酸（0.44 mol/L）：量取 36.6 mL 盐酸溶于水中，冷却后定容至 1000 mL。

4.9 氢氧化钠溶液（600 g/L）：称取 300 g 氢氧化钠溶解于水中，冷却后定容至 500 mL。

4.10 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 40 g 氢氧化钠溶解于水中，冷却后定容至 1000 mL。

4.11 肌醇标准溶液

4.11.1 肌醇标准贮备液 (0.2 mg/mL)：肌醇标准品置于装有五氧化二磷的干燥器中干燥 24 h 以上，称取 50 mg 肌醇标准品 (4.2) (精确到 0.1 mg)，用水充分溶解，定容至 250 mL，贮存于冰箱中。

4.11.2 肌醇标准中间液 (10 µg/mL)：吸取 5 mL 肌醇标准贮备液 (4.11.1) 用水定容到 100 mL，贮存于冰箱。

4.11.3 肌醇标准工作液 (1 µg/mL 和 2 µg/mL)：吸取 10 mL 肌醇标准中间液 (4.11.2) 两次，分别用水定容到 100 mL 和 50 mL。该工作液需每次临用前配制。

4.12 干燥剂：五氧化二磷 (P₂O₅)。

4.13 玻璃珠：直径约 5 mm。

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：30 °C ± 1 °C。

5.7 振荡培养箱：30 °C ± 1 °C，振荡速度 140 次/min ~ 160 次/min。

5.8 冰箱：2 °C ~ 5 °C。

5.9 无菌吸管：10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器或吸头。

5.10 瓶口分液器：0 mL ~ 10 mL。

5.11 锥形瓶：200 mL。

5.12 容量瓶 (A 类)：100 mL，250 mL，500 mL。

5.13 单刻度移液管 (A 类)：容量 5 mL。

5.14 漏斗：直径 90 mm。

5.15 定量滤纸：直径 90 mm。

5.16 试管：18 mm × 180 mm。

注：玻璃仪器使用前，用活性剂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 菌种复苏

将菌株(4.1)活化后接种到麦芽浸粉琼脂斜面培养基(4.5.1)上, 30℃±1℃培养16h~24h后, 再转接2代~3代来增强活力, 制成贮备菌种, 贮于冰箱(8.5)中, 保存期不要超过2周。临用前接种到新的麦芽浸粉琼脂斜面培养基上。

6.1.2 接种菌悬液的制备

在使用的前一天将贮备菌种转接到新配制的麦芽浸粉琼脂斜面培养基上, 于30℃±1℃培养16h~24h。用接种环刮取菌苔到一支灭菌氯化钠溶液(4.6)试管中。以2000转/分钟离心2min~3min, 倾出上清液, 加入10mL氯化钠溶液(4.6), 振荡混匀, 再离心2min~3min, 如此清洗3次~4次。吸取一定量的该菌液移入装有10mL氯化钠溶液(4.6)的试管中, 制成接种菌悬液。

用分光光度计, 以氯化钠溶液(4.6)作空白, 550nm波长下测定该接种菌悬液的透光率, 调整加入的菌液量或者加入一定量的氯化钠溶液使该菌悬液透光率在60%~80%。

6.2 试样的处理

6.2.1 称取约含肌醇0.5mg~2.0mg的试样(精确至0.1mg)于250mL三角瓶中, 对于干粉试样加入80mL盐酸(4.8), 对于液体试样加入100mL盐酸(4.8), 混匀, 使干粉试样溶解。

6.2.2 将三角瓶以铝箔纸覆盖, 在灭菌釜中125℃消化1h。取出, 冷却至室温, 加入约2mL氢氧化钠溶液(4.9), 冷却。用氢氧化钠溶液(4.10)或盐酸溶液(4.7)调pH至5.2, 转入250mL容量瓶中, 定容至刻度。混匀, 过滤, 收集滤液, 该滤液为待测液。调整稀释度, 使待测液肌醇的浓度在1μg/mL~10μg/mL范围内。

6.3 标准曲线的制作

按表1顺序加入蒸馏水、肌醇标准工作液(4.11.3)和肌醇测定培养基(4.5.2)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
蒸馏水(mL)	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
肌醇标准工作液 1 μg/mL (mL)	0	0	1	2	3	4	5	0	0	0
肌醇标准工作液 2 μg/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顺序加入蒸馏水、待测液(6.2.2)和肌醇测定培养基(4.5.2)于培养管中, 一式三份。

表2 待测液的制作

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

6.5 灭菌

每支试管内加入一粒玻璃珠(4.13)，盖上试管帽，121℃灭菌5 min(商品培养基按标签说明进行灭菌)。

6.6 接种

将上述试管迅速冷却至30℃以下。用滴管或移液器向上述试管中各滴加一滴(约50 μL)接种菌悬液(6.1.2)，其中标准曲线管中的接种空白试管S1除外。

6.7 培养

将试管固定在振荡培养箱内，用约140次/min~160次/min的振荡速度，在30℃±1℃振荡培养22 h~24 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 从振荡培养箱内取出试管，放入灭菌釜内，100℃保持5 min，使微生物停止生长。

6.8.2 用接种空白试管S1(6.3)作空白，将分光光度计透光率调到100%(或吸光度A为0)，读出接种空白试管S2(6.3)的读数。再以接种空白试管S2为空白，调节透光率为100%(或A为0)，依次读出其他每支试管的透光率(或吸光度A)。

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540 nm~660 nm，待读数稳定30 s后，读出透光率，每支试管稳定时间要相同。以肌醇标准品的含量为横坐标，透光率为纵坐标作标准曲线。

6.8.4 根据待测液的透光率，从标准曲线中查得该待测液中肌醇的浓度，再根据稀释因子和称样量计算出试样中肌醇的含量。透光率超出标准曲线管S3~S10范围的试样管要舍去。

6.8.5 对每个编号的待测液的试管，用每支试管的透光率计算每毫升该编号待测液肌醇的浓度，并计算该编号待测液的肌醇浓度平均值，每支试管测得的该浓度不得超过该平均值的±15%，超过者要舍去。如果符合该要求的管数少于所有的四个编号的待测液的总管数的2/3，用于计算试样含量的数据是不充分的，需要重新检验。如果符合要求的管数超过原来管数的2/3，重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液肌醇含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x ，用于计算试样中的肌醇含量。

注：绘制标准曲线，既可读取透光率(T%)，也可读取吸光度(A)。

7 分析结果的表述

试样中肌醇的含量按式(1)计算：

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

式中：

X——试样中肌醇的含量，单位为毫克每百克(mg/100 g)；

C_x ——6.8.5中计算所得的总平均值，单位为微克(μg)；

m——试样的质量，单位为克(g)；

f——稀释倍数。婴幼儿食品和乳品f为250。

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 气相色谱法

9 原理

试样中的肌醇用水和乙醇提取后，与硅烷化试剂衍生，正己烷提取，经气相色谱分离，外标法定量。

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 无水乙醇(C_2H_6O)。

10.2 正己烷(C_6H_{14})。

10.3 乙醇 (95%)。

10.4 乙醇 (70%)。

10.5 三甲基氯硅烷(C_3H_9ClSi)。

10.6 六甲基二硅胺烷($C_6H_{19}NSi_2$)。

10.7 N, N-二甲基甲酰胺(C_3H_7NO)。

10.8 硅烷化试剂：分别吸取体积比为 1: 2: 8 的三甲基氯硅烷、六甲基二硅胺烷、N, N-二甲基甲酰胺，超声混匀，临用前配制。

10.9 肌醇标准品：纯度 $\geq 99\%$ 。

10.10 肌醇标准溶液 (0.010 mg/mL)：称取 100 mg (精确至 0.1 mg) 经过 $105\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干 2 h 的肌醇标准品 (10.9) 于 100 mL 容量瓶中，用 25 mL 水溶解完全。用乙醇 (10.3) 定容至刻度，混匀。取 1 mL 此溶液于 100 mL 容量瓶中，用乙醇 (10.4) 定容至刻度，混匀。

11 仪器和设备

11.1 天平：感量为 0.1 mg。

11.2 气相色谱仪，带 FID 检测器。

11.3 离心机：转速 ≥ 5000 转/分钟。

11.4 旋转蒸发仪。

11.5 超声波清洗器。

11.6 恒温热水浴槽。

11.7 带有罗纹盖的 25 mL 试管。

12 分析步骤

12.1 试样处理与衍生

12.1.1 试样处理：固体试样混合均匀后称取 1 g（精确至 0.0001 g），于 50 mL 容量瓶中，加入 12 mL 约 40 °C 温水溶解试样；液体试样直接称取 12 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL 容量瓶中。上述试样超声提取约 10 min，用乙醇（10.3）定容至刻度，混匀。静置约 20 min 后，取 10 mL 于 15 mL 离心管中，以不低于 4000 转/分钟离心约 5 min。取上清液 5 mL 于旋转蒸发器浓缩瓶中。

12.1.2 干燥与衍生：向浓缩瓶中加入 10 mL 无水乙醇（10.1），在 80 °C ± 2 °C 下旋转浓缩至近干时再加入 5 mL 无水乙醇（10.1）继续浓缩至彻底干燥（有水将使下步硅烷化不彻底）。加入硅烷化试剂（10.8）10 mL，超声溶解 5 min 并转移至 25 mL 有螺纹盖的离心管中，放于 80 °C ± 2 °C 水浴中衍生反应约 75 min，期间每隔约 20 min 取出震荡一次，然后取出冷却至室温。加入 5 mL 正己烷（10.2），振荡混合后静止分层。取上层液 3 mL 于预先加少许无水硫酸钠的带螺纹盖离心管中，振荡后以不低于 4000 转/分钟离心，此为试样测定液。

12.2 标准测定液的制备

分别吸取 0.0 mL，2.0 mL，4.0 mL，6.0 mL，8.0 mL，10.0 mL 肌醇标准溶液（10.10）于浓缩瓶中，按 12.1.2 步骤操作。

12.3 测定

12.3.1 参考色谱条件

色谱柱：填料为 50 % 氰丙基-甲基聚硅氧烷的毛细管柱（柱长 60 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μm）或同等性能的色谱柱。

进样口温度：280 °C。

检测器温度：300 °C。

分流比：10: 1。

进样量：1.0 μL。

程序升温见表 3：

表 3 程序升温

升温速率 (°C/min)	温度 (°C)	持续时间 (min)
	120	0
10	190	50
10	220	3

12.3.2 标准曲线制作

分别将标准溶液测定液（12.2）注入到气相色谱仪中（色谱图参见附录 B），以测得的峰面积（或峰高）为纵坐标，以肌醇标准测定液中肌醇的含量为横坐标制作标准曲线。

12.3.3 试样溶液的测定

分别将试样测定液（12.1.2）注入到气相色谱仪中得到峰面积（或峰高），从标准曲线中获得试样测定液中肌醇的含量（mg）。

13 分析结果的表述

试样中肌醇含量按式 (2) 计算：

$$X = \frac{C_s \times f_i}{m_i} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中肌醇含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

C_s ——从标准曲线中获得试样测定液肌醇的含量，单位为毫克（mg）。

m_t ——试样的质量，单位为克（g）。

f_t ——试样测定液所含肌醇换算成试样中所含肌醇的系数为 10。

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

本标准第一法、第二法检出限均为 2.0 mg/100 g。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 麦芽浸粉琼脂培养基 (Malt Extract Agar)

A.1.1 成分

麦芽糖 12.75 g, 糊精 2.75 g, 丙三醇 2.35 g, 蛋白胨 0.78 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 4.7±0.2 (25 °C ±5 °C)。

A.1.2 制法

先将除琼脂以外的其他成分溶解于蒸馏水中, 调节 pH, 再加入琼脂, 加热煮沸, 使琼脂溶化。混合均匀后分装试管, 每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min, 摆成斜面备用。

A.2 肌醇测定培养基

A.2.1 成分

葡萄糖 100 g, 柠檬酸钾 10 g, 柠檬酸 2 g, 磷酸二氢钾 1.1 g, 氯化钾 0.85 g, 硫酸镁 0.25 g, 氯化钙 0.25 g, 硫酸锰 50 mg, 氯化亚铁 50 mg, DL-色氨酸 80 mg, L-胱氨酸 0.1 g, L-异亮氨酸 0.5 g, L-亮氨酸 0.5 g, L-赖氨酸 0.5 g, L-蛋氨酸 0.2 g, DL-苯基丙氨酸 0.2 g, L-酪氨酸 0.2 g, L-天门冬氨酸 0.8 g, DL-天门冬氨酸 0.2 g, DL-丝氨酸 0.1 g, 甘氨酸 0.2 g, DL-苏氨酸 0.4 g, L-缬氨酸 0.5 g, L-组氨酸 0.124 g, L-脯氨酸 0.2 g, DL-丙氨酸 0.4 g, L-谷氨酸 0.6 g, L-精氨酸 0.48 g, 盐酸硫胺素 500 μg, 生物素 16 μg, 泛酸钙 5 mg, 盐酸吡哆醇 1 mg, 蒸馏水 1000 mL, pH 5.2±0.2 (25 °C ±5 °C)。

A.2.2 制法

将上述成分溶解于水中, 调节 pH, 备用。

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。

附录 B
(资料性附录)

肌醇标准衍生物气相色谱图

B.1 肌醇标准衍生物气相色谱图

肌醇标准衍生物气相色谱图 B.1。

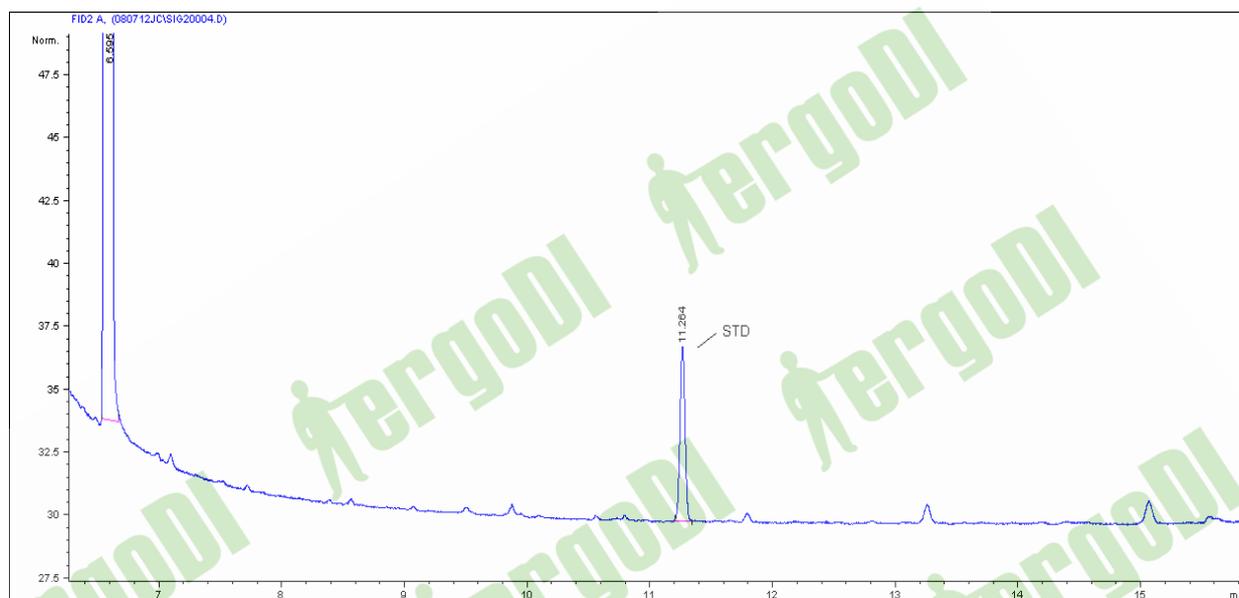


图 B.1 肌醇标准品衍生物气相色谱图