

<a href="#">食品资讯</a>	<a href="#">法律法规</a>	<a href="#">食品技术</a>	<a href="#">质量体系</a>	<a href="#">检验技术</a>
<a href="#">食品标准</a>	<a href="#">食品资料</a>	<a href="#">仪器设备</a>	<a href="#">食品图库</a>	<a href="#">食品安全</a>
<a href="#">食品人才</a>	<a href="#">专业英语</a>	<a href="#">食品网刊</a>	<a href="#">食品课堂</a>	<a href="#">食品专题</a>
<a href="#">食品网址</a>	<a href="#">食品论坛</a>	<a href="#">食品家园</a>	<a href="#">考试中心</a>	<a href="#">培训中心</a>
<a href="#">食品词典</a>	<a href="#">食品书店</a>	<a href="#">食品百科</a>	<a href="#">数据库</a>	<a href="#">行业知道</a>

## GB/T 5413系列标准汇编（1997版）

此标准汇编由[食品伙伴网](#)整理完成，欢迎下载。本汇编共收录1997版的GB/T 5413系列标准32个，pdf格式，有书签方便查看，共计144页。

### 免责声明：

本汇编中收集的所有标准均来源于互联网，仅供食品同行交流学习，请勿作他用，本站不承担任何技术及版权问题。

如有疑问请与我们联系：[foodstandard@126.com](mailto:foodstandard@126.com)，QQ:363986600.

HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5413.1—1997

---

## 婴幼儿配方食品和乳粉 蛋白质的测定

Milk powder and formula foods for infant and young children—  
Determination of protein

MACY INSTRUMENT  
专业光度计系列生产厂家  
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

1997-05-28 发布

1998-09-01 实施

国家技术监督局 发布

## 前 言

本标准仅对 GB 5413—85 中 A.3 章“半微量凯氏定氮法”的文本格式进行了修改,内容未做改动。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、黄敏、李玉贤。



# 中华人民共和国国家标准

## 婴幼儿配方食品和乳粉 蛋白质的测定

GB/T 5413.1—1997

代替 GB 5413—85

### Milk powder and formula foods for infant and young children —Determination of protein

#### 1 范围

本标准规定了蛋白质的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中蛋白质的测定。

#### 2 方法提要

在加热时,硫酸分解成亚硫酸酐、水和氧。有机物被氧化为二氧化碳和水,而蛋白质的氨态氮与过量硫酸反应转变为硫酸铵,硫酸铵在碱性溶液中进行蒸馏。将蒸馏出来的氨用硼酸吸收,再用酸标准溶液滴定。

#### 3 试剂

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 浓硫酸。

3.2 硫酸钾。

3.3 硫酸铜。

3.4 过氧化氢溶液:体积分数为 30%。

3.5 硼酸溶液: $c(\text{H}_3\text{BO}_3)$ 为 30g/L。取 30 g 硼酸,溶解在 1L 水中。

3.6 甲基红-溴甲酚绿混合指示剂:用体积分数为 95%的乙醇,将溴甲酚绿及甲基红分别配成 1g/L 的乙醇溶液,使用时按 1g/L 溴甲酚绿:1g/L 甲基红为 5:1 的比例混合。

3.7 硫酸标准溶液: $c(\text{H}^+)$ 为 0.0500mol/L。取 3mL 浓硫酸加到 15mL 水中,冷却后洗入 1000mL 容量瓶中,定容。

3.8 氢氧化钠溶液,质量比为 400/1000。称取 400g 氢氧化钠,用 1000mL 水溶解,待冷却后移入试剂瓶中。

#### 4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 凯氏烧瓶:500mL 或 250mL。

4.2 定氮蒸汽蒸馏器。

4.3 滴定管:25mL。

4.4 三角烧瓶:250mL。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

## 5 操作步骤

### 5.1 样品的制备

将样品全部移入约两倍于样品体积的洁净干燥容器中,立即盖紧容器,反复旋转振荡,使样品彻底混合均匀。

### 5.2 测定

5.2.1 称取样品 2g,精确至 0.2mg,放入凯氏烧瓶(4.1)中,加入 10g 硫酸钾(3.2)和 1g 硫酸铜(3.3),量取 20mL 浓硫酸(3.1),徐徐加入凯氏烧瓶中,混合。

注

1 加入样品及试剂时,避免粘附在瓶颈上。

2 加入硫酸钾的作用:提高硫酸的沸点(338℃),增进反应速度。10g 硫酸钾将沸点提高到 400℃,但过多的硫酸钾会造成沸点太高,生成的硫酸氢铵在 513℃会分解。

3 加入硫酸铜的作用:作催化剂,使氧化作用加速。

5.2.2 凯氏烧瓶的瓶口放一小漏斗,用微火加热(小心瓶内泡沫冲出而影响结果),当瓶内发泡停止,稍加大火力。同时,可分数次加入 10mL 过氧化氢溶液(3.4)(但必须将烧瓶冷却数分钟以后加入)。当烧瓶内容物的颜色逐渐转化成透明的淡绿色时,继续消化 0.5~1h(若凯氏烧瓶壁粘有碳化粒时,进行摇动或待瓶中内容物冷却数分钟后,用过氧化氢溶液冲下,继续消化至呈透明为止)。然后取下并使之冷却。

5.2.3 将澄清的消化液小心移入 100mL 容量瓶中,以水洗三次凯氏烧瓶,洗涤液并入上述容量瓶中,冷却后稀释至刻度并摇匀。

5.2.4 吸取 25mL 消化液于定氮蒸馏器中,在冷凝器的下端放置一个盛有 50mL 硼酸溶液(3.5)、3 滴甲基红-溴甲酚绿混合指示剂(3.6)的 250mL 锥形瓶,使冷凝器下端的玻璃管在液面以下。将 25mL 氢氧化钠溶液慢慢地加入蒸馏瓶中(溶液应呈强碱性),迅速将塞子塞好,然后通入蒸汽进行蒸馏,蒸至液面达 150mL 时,提出冷凝器下端的玻璃管,用蒸馏水冲洗冷凝管下端,将洗液一并聚集于硼酸溶液中,让玻璃管靠在锥形瓶的瓶壁,出液口在 200mL 刻度线以上,继续蒸馏,蒸至液位达 200mL。

注:蒸馏时要注意蒸馏情况,避免瓶中的液体发泡冲出,进入接受瓶。火力太弱,蒸馏瓶内压力减低,则接受瓶内液体会倒流,造成实验失败。

5.2.5 用硫酸标准溶液(3.7)滴定至溶液出现酒红色为止,记录所用硫酸标准溶液的体积。同时进行空白试验,并在结果中加以校正。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中蛋白质含量(g/100g)} = \frac{(V - V_0) \times c(\text{H}^+) \times 2 \times 0.014 \times F}{m \times \frac{25}{100}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $V$ ——滴定时消耗硫酸标准溶液的体积, mL;

$V_0$ ——空白试验消耗硫酸标准溶液的体积, mL;

$c(\text{H}^+)$ ——硫酸标准溶液中  $\text{H}^+$  的浓度, mol/L;

$m$ ——样品的质量, g;

0.014——氮原子的摩尔质量, kg/mol;

$F$ ——氮换算为蛋白质的系数。乳粉为 6.38, 纯谷物类(配方)食品为 5.90, 含乳婴幼儿谷物(配方)食品为 6.25。

注:空白实验仅不加入样品,操作步骤与样品相同。

## 7 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过平均值的 1.5%。

---



## 前 言

本标准参考了日本森永公司的乳清蛋白测定方法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:哈尔滨森永乳品有限公司、国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:于丽坤、张燕杰、赵勤。



婴幼儿配方食品和乳粉  
乳清蛋白的测定

GB/T 5413.2—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of whey protein

1 范围

本标准规定了酪蛋白与乳清蛋白含量比率的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中酪蛋白与乳清蛋白含量比率的测定。

2 方法提要

试样用 SDS-聚苯烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, Laemmli 法)后,用光密度计对按分子量顺序分离开的酪蛋白与乳清蛋白各谱带进行测定,求得酪蛋白与乳清蛋白的含量比率。

3 试剂

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 电泳缓冲液:将 Tris(hydroxymethyl)aminomethane 7.5g、甘氨酸 36g、SDS 2.5g 溶于蒸馏水中,定容至 500mL。使用前以蒸馏水稀释 5 倍后使用。

3.2 SDS 试样缓冲液:0.125mol/L Tris-盐酸(pH6.8),体积分数 20%的甘油,4%(m/V)SDS,体积分数 10% 2-mercaptoethanol,质量分数 0.0025%的溴酚蓝(bromophenol blue)。

3.3 染色剂:质量分数 0.1%考马斯蓝 R-250(Coomassie brilliant blue R-250),体积分数 10%的甲醇,体积分数 7.5%的乙酸。

3.4 脱色剂:体积分数 10%的甲醇,体积分数 7.5%的乙酸。

3.5 酪蛋白。

3.6 精制乳清蛋白(WPC)。

3.7 SDS-PAGE:用梯度凝胶(10%~20%)或同效凝胶。

4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 平板式电泳槽。

4.2 供电设备。

4.3 光密度计。

5 操作步骤

5.1 样液的制备

将试剂按蛋白质 10~20 $\mu$ g/ $\mu$ L 的浓度范围溶解在蒸馏水中。加入 1 $\mu$ L 试样同体积的 SDS 试样缓冲



液,在煮沸热水中静置 5min 后,作为试样液。

## 5.2 标准溶液的制备

使用前,酪蛋白和乳清蛋白的蛋白质浓度按凯氏(Kjeldahl)法精确测定。将酪蛋白和乳清蛋白按上述方法分别进行溶解和处理后作为标准溶液。此外,还可将酪蛋白与乳清蛋白的标准溶液按蛋白质含量的任意比率(比如蛋白质的浓度比为 75 : 25,50 : 50,25 : 75)进行混合作为混合标准溶液。

## 5.3 电泳

将凝胶设置在电泳槽中,加入电泳缓冲液。试样溶液与标准溶液的添加量为每孔 10 $\mu$ L。电泳时间因电泳凝胶的种类不同而异。以 10%~20%的梯度复合凝胶进行电泳时,定电流为 40mA,时间为 60min。电泳结束时间可按溴酚蓝的蓝谱带到达离凝胶下端 5mm 时为标志。电泳结束后将凝胶放入染色液中振荡染色 1h,然后转入脱色液中振荡脱色 12h 再移到蒸馏水中。

## 5.4 测定

以光密度计对带色的各谱带进行测定,求得其颜色深度(OD)的积分值(=Trace 值)。

## 6 分析结果的表述

### 6.1 谱带的测定

电泳后的谱带中,参照分子量以及标准酪蛋白与乳清蛋白的电泳图,分别选择以下谱带进行计算。

(1)酪蛋白: $\alpha_3$ -酪蛋白(分子量 23500), $\beta$ -酪蛋白(分子量 24000), $\kappa$ -酪蛋白(分子量 19000);

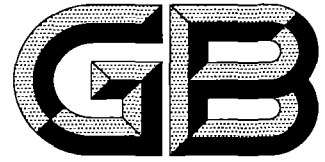
(2)乳清蛋白: $\alpha$ -乳白蛋白(分子量 14000), $\beta$ -乳球蛋白(分子量 18000),血清白蛋白(分子量 66000)。

### 6.2 计算方法

将以上三种酪蛋白谱带的 Trace 值合计,再除以该条泳线中所有谱带的 Trace 值的总和,求得酪蛋白的比率( $C_1$  值)。以同样方式将以上三种乳清蛋白谱带的 Trace 值合计,再除以该条泳线中所有谱带 Trace 值的总和,求得乳清蛋白的比率( $W_1$  值)。

当以酪蛋白与乳清蛋白的单独溶液为标准溶液时,按以上方法分别求得标准酪蛋白的  $C_1$  值(= $C_1$  值)与标准乳清蛋白的  $W_1$  值(= $W_1$  值)。将试样的  $C_1$  值与  $W_1$  值分别除以  $C_1$  值与  $W_1$  值,求得暂定的酪蛋白含量比率( $C_2$  值)与乳清蛋白的含量比率( $W_2$ )。当  $C_2$  值 +  $W_2$  值不等于 1 时,将  $C_2$  值、 $W_2$  值分别除以  $C_2$  值与  $W_2$  值的总和进行补整,求得试样中的酪蛋白以及乳清蛋白的比率。

当以酪蛋白与乳清蛋白的混合溶液为标准溶液时,按以上方法分别求得各混合比率中酪蛋白的  $C_1$  值与乳清蛋白的  $W_1$  值。将混合标准溶液的  $C_1$  值与酪蛋白含量比,以及  $W_1$  值与乳清蛋白含量比做成坐标检量线,利用该检量线求得试样的  $C_2$  值与  $W_2$  值。当  $C_2$  值 +  $W_2$  值不等于 1 时,将  $C_2$  值、 $W_2$  值分别除以  $C_2$  值与  $W_2$  值的总和进行补整,求得试样中酪蛋白以及乳清蛋白的比率。



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5413.3—1997

## 婴幼儿配方食品和乳粉 脂肪的测定

Milk powder and formula foods for infant and young children—  
Determination of fat

1997-05-28 发布

1998-09-01 实施

国家技术监督局 发布

## 前 言

本标准等同采用国际乳品联合会标准 IDF 9C:1987《乳粉、乳清粉、酪乳粉和乳浆粉——脂肪含量的测定——罗兹-哥特里重量分析法(基准法)》。该方法准确度高,是测定乳、乳粉、婴幼儿配方食品中脂肪含量的基准方法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、黄敏、张天舒。



# 中华人民共和国国家标准

## 婴幼儿配方食品和乳粉 脂肪的测定

GB/T 5413.3—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of fat

### 1 范围

本标准规定了脂肪测定的基准方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中脂肪的测定。

### 2 方法提要

用乙醚和石油醚抽提样品的乙醇氨溶液,通过蒸馏或蒸发去除溶剂,测定溶于醚中的抽提物的质量。

### 3 试剂

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。

按 5.3 规定的步骤进行空白试验,检验试剂的纯度。按 5.4 的操作准备一空的脂肪收集瓶用来校正环境的影响。试剂残余物含量不得大于 0.5mg(见 8.1)。

如果全部试剂空白残余物大于 0.5mg,则分别蒸馏 100mL 乙醚和石油醚,测定溶剂残余物的含量。用空的控制瓶测得的量和每种溶剂的残余物的含量都不应超过 0.5mg。

更换不合格的试剂,或对试剂进行提纯。

#### 3.1 淀粉酶。

#### 3.2 氨溶液:质量分数约 25%, $\rho_{20}$ 约 910g/L。

注:如果买不到此浓度的氨溶液,可使用已知的、更大浓度的氨溶液(见 5.5.2)。

#### 3.3 乙醇或由甲醇变性的乙醇:体积分数至少为 94%(见 8.5)。

#### 3.4 刚果红溶液:1g 刚果红溶于水中,稀释至 100mL。

注:可选择性地使用。刚果红溶液可使溶剂和水相界面清晰(见 5.5.4),也可使用其他能使水相染色而不影响测定结果的溶液。

#### 3.5 乙醚:不含过氧化物(见 8.3),不含抗氧化剂,或抗氧化剂含量不大于 2mg/kg,并满足空白试验的要求(见第 3 章、8.1 和 8.4)。

#### 3.6 石油醚:沸程 30~60℃。

#### 3.7 混合溶剂:等体积混合乙醚(3.5)和石油醚(3.6),使用前制备。

### 4 仪器

由于测定中使用了挥发性可燃溶剂,所有电器的使用均应按照这些溶剂使用的有关规定进行。

常用实验室仪器及:

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

4.1 分析天平。

4.2 离心机:可安放抽脂瓶或管(4.6),转速为 500~600r/min,可在抽脂瓶外端产生 80~90g 的重力场。

注:可选择性使用。

4.3 蒸馏器或蒸发器:可在不超过 100℃情况下,蒸馏除掉脂肪收集瓶中的溶剂和乙醇,或蒸发除掉烧杯或皿中的溶剂和乙醇(见 5.5.10,5.5.14)。

4.4 烘箱:电热的,通风口完全打开,工作区域温度可控制在 102℃±2℃。配有适当的温度计。

4.5 水浴:温度可控制在 65℃±5℃。

4.6 毛氏抽脂瓶:抽脂瓶(或管,见注)应带有适当的优质软木塞或其他不影响溶剂使用的瓶塞(如硅胶或聚四氟乙烯)。软木塞应先浸于乙醚中(3.5),后放入 60 或 60℃以上的水中保持至少 15min,然后在水中冷却,使用时木塞已饱和。不用时要一直浸泡在水中,浸泡用水每天更换一次。

注:也可使用带虹吸管或洗瓶的抽脂管(或烧瓶),但操作步骤有所不同,见附录 A 中规定。接头的内部长支管下端可成勺状。

4.7 支架:放置抽脂瓶(或管)。

4.8 洗瓶:适合装混合溶剂(3.7)。不能使用塑料洗瓶。

4.9 脂肪收集瓶:例如:容量为 125~250mL 可加热烧瓶(平底烧瓶),250mL 锥形瓶或金属皿。若使用金属皿,最好为不锈钢、平底、有溢流口的,直径为 80~100mm,高约 50mm。

4.10 沸石:无脂肪、无气孔的瓷片或碳化硅或玻璃珠(用金属皿的情况下)。

4.11 量筒:5mL 和 25mL。

4.12 吸量管:带刻度的,10mL。

4.13 金属夹钳:用于夹烧瓶、烧杯或皿。

4.14 毛氏抽脂瓶摇混器:可夹放毛氏抽脂瓶,摆动频率为 100±10 次/min。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品的制备

反复转动样品容器,使样品充分混合(必要时,将实验样品全部移入大的密闭容器中之后,再进行此操作)。

### 5.2 样品部分

轻轻搅拌或转动样品容器,以便混合实验样品(5.1),立即取样,直接放在抽脂瓶(4.6)或其他容器中,精确至 1mg,取样量如下:

a) 高脂乳粉、全脂乳粉、全脂加糖乳粉和配方乳粉:约 1g。

b) 部分脱脂乳粉:约 1.5g。

c) 脱脂乳粉:约 1.5g。

d) 乳清粉:约 1.5g。

e) 酪乳粉:约 1.5g。

f) 含乳婴儿谷物(配方)食品:约 1.5g。

### 5.3 空白试验

空白试验与样品检验同时进行,使用相同步骤和相同试剂,但用 10mL 水(见 8.2)代替已稀释的样品(5.5.1)。

### 5.4 脂肪收集瓶的准备

于干燥的收集瓶(4.9)中加入几粒沸石(4.10),放入烘箱(4.4)中干燥 1h。使收集瓶冷却(防尘)至天平室的温度(玻璃收集瓶至少需要 1h,金属皿至少 0.5h)。

注

- 1 在去除溶剂过程中,特别是使用玻璃收集瓶时,沸石可以使沸腾均匀。用金属皿时,也可选择地使用沸石。
- 2 收集瓶不可放入干燥器中,避免冷却不充分或冷却时间过长。

用夹钳(4.13)(为避免温度的变化)将收集瓶放到天平上称量,精确至 0.1mg。

## 5.5 测定

### 5.5.1 样品处理

#### 5.5.1.1 不含淀粉样品

加入 10mL  $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  的水,将试样洗入抽脂瓶的小球中,充分混合,直到样品完全分散,放入流动水中冷却。

#### 5.5.1.2 含淀粉样品

将样品放入毛氏抽脂瓶中,加入约 0.1g 的淀粉酶和一小磁性搅拌棒,混合均匀后,加入 8~10mL  $45^{\circ}\text{C}$  的蒸馏水,注意液面不要太高。

盖上瓶塞于搅拌状态下,置  $65^{\circ}\text{C}$  水浴中 2h,每隔 10min 摇混一次。检验淀粉是否水解完全:加入两滴约 0.1mol/L 的碘溶液,无蓝色出现,水解完全,否则将抽脂瓶重新置于水浴中,直至无蓝色产生。

冷却毛氏抽脂瓶。

5.5.2 加入 2mL 氨溶液(3.2)或同体积的浓氨溶液(见 3.2 注),在小球中与已溶解的样品充分混合。加入氨水后,应马上进行下一步骤。

5.5.3 将抽脂瓶放入  $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  的水浴(4.5)中,加热 15~20min,时而振荡一次,取出,冷却至室温。含淀粉样品不需水浴,静止 30s 后即可进行下面的步骤。

5.5.4 加入 10mL 乙醇(3.3),轻轻地使内容物在小球和柱体间来回流动,和缓但彻底地进行混合,避免液体太接近瓶颈。如果需要,可加入 2 滴刚果红溶液(3.4)。

5.5.5 加入 25mL 乙醚(3.5),塞上被水饱和的软木塞(见 4.6),或用水浸湿的其他瓶塞,将抽脂瓶保持在水平位置,小球的延伸部分朝上夹到摇混器上,按约 100 次/min 振荡烧瓶 1min,不要过度(避免形成持久乳化液)。在此期间,使液体由大球冲入小球。

必要时将抽脂瓶放在流水中冷却,然后小心地打开塞子,用少量的混合溶剂(3.7)冲洗塞子和瓶颈〔冲洗时使用洗瓶(4.8)〕,使冲洗液流入抽脂瓶或已准备好的脂肪收集瓶中(见 5.4)。

5.5.6 加入 25mL 石油醚(3.6),塞上重新润湿的塞子(浸入水中),接 5.5.5 所述,轻轻振荡 30s。

5.5.7 将加塞的抽脂瓶放入离心机(4.2)中,在 500~600r/min 下离心 1~5min。如果没有离心机,则将抽脂瓶放到支架上(4.7),静止至少 30min,直到上层液澄清,并明显与水相分离。必要时,放在流水中冷却抽脂瓶。

5.5.8 小心地打开软木塞或瓶塞,用少量的混合溶剂冲洗塞子和瓶颈内壁,使冲洗液流入抽脂瓶或脂肪收集瓶中。

如果两相界面低于小球与瓶身相接处,则沿瓶壁边缘慢慢地加入水,使液面高于小球和瓶身相接处(见图 1),以便于倾倒。

5.5.9 持抽脂瓶的小球部,小心地将上层液尽可能地倒入已准备好的含有沸石的脂肪收集瓶中(也可选用金属皿),避免倒出水层(见图 2)。

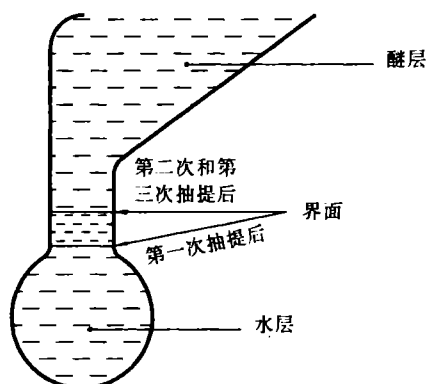


图1 倾倒醚层前

(5.5.8, 5.5.12, 5.5.13)

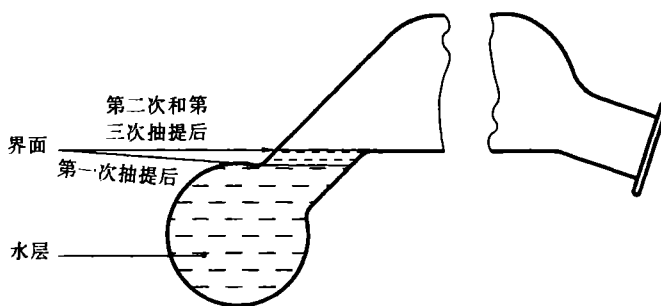


图2 倾倒醚层后

(5.5.9, 5.5.12, 5.5.13)

5.5.10 用少量混合溶剂冲洗瓶颈外部,冲洗液收集在脂肪收集瓶中。要小心操作,以防溶剂溅到抽脂瓶的外面。

最好按 5.5.14 所述,采用蒸馏或蒸发的方法,去除脂肪收集瓶中的溶剂或部分溶剂。

5.5.11 向抽脂瓶中加入 5mL 乙醇(3.3),用乙醇冲洗瓶颈内壁,按 5.5.4 所述进行混合。

5.5.12 重复 5.5.5~5.5.10 操作,进行第二次抽提,但只用 15mL 乙醚(3.5)和 15mL 石油醚(3.6),用混合溶剂(3.7)冲洗瓶颈内壁。

5.5.13 重复 5.5.5~5.5.9 操作,进行第三次抽提,但只用 15mL 乙醚(3.5)和 15mL 石油醚(3.6),用混合溶剂(3.7)冲洗瓶颈内壁。

注:如果产品中脂肪的质量分数低于 5%,可省略第三次抽提。

5.5.14 采用蒸馏的方法除去收集瓶中的溶剂(包括乙醇),对烧杯或皿可用蒸发(4.3)来除掉溶剂。蒸馏前用少量混合溶剂(3.7)冲洗瓶颈内部。

5.5.15 将脂肪收集瓶放入  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  的烘箱(4.4)中加热 1h,取出收集瓶,冷却至天平室的温度(不要放入干燥器中,但要防尘,玻璃容器冷却至少 1h,金属容器冷却至少 0.5h)。称量,精确至 0.1mg。称量前不要擦收集瓶。用夹钳将收集瓶放到天平上(避免温度变化)。

5.5.16 重复 5.5.15 操作,直到脂肪收集瓶两次连续称量不超过 0.5mg,记录收集瓶和抽提物的最低质量。

5.5.17 为验证抽提物是否全部溶解,向脂肪收集瓶中加入 25mL 石油醚,微热,振摇,直到脂肪全部溶解。

如果抽提物全部溶于石油醚中,则含抽提物的收集瓶的最终质量(见 5.5.16)和最初质量(见 5.4)之差,即为脂肪含量。

5.5.18 若抽提物未全部溶于石油醚中,或怀疑抽提物是否全部为脂肪,则用热的石油醚洗提。允许微量的不溶物质沉淀。小心地倒出石油醚,不要倒出任何不溶物,重复此操作 3 次以上,再用石油醚冲洗收集瓶口的内部。

最后,用混合溶剂冲洗收集瓶口的外部,避免溶液溅到瓶的外壁。将脂肪收集瓶放入  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  的烘箱(4.4)中,加热 1h,按 5.5.15 和 5.5.16 所述去除石油醚,冷却,称量。

取 5.5.16 中测得的质量和 5.5.18 测得的质量之差作为脂肪的质量。

注:选择带有虹吸管或洗瓶附件的抽脂管时(见 4.6 注),步骤如附录 A(标准的附录)所述。

## 6 分析结果表述

$$\text{样品中脂肪含量(g/100g)} = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$



式中： $m_0$ ——样品的质量(5.2),g;

$m_1$ ——5.5.16中测得的脂肪收集瓶和抽提物的质量,g;

$m_2$ ——脂肪收集瓶的质量(5.4),或在有不溶物存在下,5.5.18中测得的脂肪收集瓶和不溶物的质量,g;

$m_3$ ——空白试验(5.3)中,脂肪收集瓶和5.5.16中测得的抽提物的质量,g;

$m_4$ ——空白试验(5.3)中脂肪收集瓶(见5.4)的质量,或在有不溶物存在时,5.5.18中测得的脂肪收集瓶和不溶物的质量,g。

报告质量分数结果精确至0.01%。

## 7 允许差

### 7.1 重复性

在短时间间隔内,由同一分析人员对同一样品所做的两次单独试验的结果之差,应不超过下列值:

——高脂乳粉、全脂乳粉、全脂加糖乳粉和配方乳粉	0.2 g 脂肪/100g 样品
——部分脱脂乳粉、酪乳粉	0.15g 脂肪/100g 样品
——脱脂乳粉	0.1 g 脂肪/100g 样品
——乳清粉	0.1 g 脂肪/100g 样品
——含乳婴儿谷物(配方)食品	0.2 g 脂肪/100g 样品

### 7.2 重现性

由不同实验室的两个分析人员对同一样品所做的两次独立试验结果之差,应不超过下列值:

——高脂乳粉、全脂乳粉、全脂加糖乳粉和配方乳粉	0.3 g 脂肪/100g 样品
——部分脱脂乳粉、酪乳粉	0.25g 脂肪/100g 样品
——脱脂乳粉	0.2 g 脂肪/100g 样品
——乳清粉	0.2 g 脂肪/100g 样品
——含乳婴儿谷物(配方)食品	0.45g 脂肪/100g 样品

## 8 实验过程注意事项

### 8.1 空白试验检验试剂

在进行空白试验时,使用一个质量控制瓶,以消除环境及温度对检验结果的影响。

在极其偶然的情况下,溶剂中可能会有易溶于脂肪的挥发性物质,此时应对所有试剂做空白试验。进行空白试验时在脂肪收集瓶中放入1g新鲜的无水奶油。必要时,于每100mL溶剂中加入1g无水奶油后重新蒸馏,重新蒸馏后必须尽快使用。

### 8.2 空白试验与样品测定同时进行

对于存在非挥发性物质的试剂可用与样品测定同时进行的空白试验值进行校正。抽脂瓶与天平室之间的温差可对抽提物的质量产生影响((5.5.16和5.4或5.5.18)。在理想的条件下(试剂空白值低,天平室温度相同,脂肪收集瓶充分冷却),该值通常小于0.5mg。在常规测定中,可忽略不计。若此值稍高( $\pm 2.5$ mg),一般也可忽略不计,校正之后,结果仍是准确的。但当校正值大于2.5mg时,检验报告中应予以说明。

如果空白试验值经常超过0.5mg,且近期没有对试剂进行检验,则应马上对试剂进行检验,更换或提纯任何不纯的试剂(第3章和8.1)。

### 8.3 乙醚中过氧化物的检验

取一只具玻璃塞小量筒,用乙醚冲洗,然后加入10mL乙醚,再加入1mL新制备的100g/L的碘化钾溶剂,振荡,静止1min,两相中均不得有黄色。

也可使用其他适当的方法检验过氧化物。



在不加抗氧化剂的情况下,为长久保证乙醚中无过氧化物,使用前三天按下法处理:

将锌箔削成长条,长度至少为乙醚瓶的一半,每升乙醚用 80cm<sup>2</sup>锌箔。

使用前,将锌片完全浸入每升中含有 10g 五水硫酸铜和 2mL 质量分数为 98%的浓硫酸溶液中 1min,用水轻轻彻底地冲洗锌片,将湿的镀铜锌片放入乙醚瓶中即可。也可以使用其他方法,但不得影响检测结果。

#### 8.4 乙醚中含抗氧化剂的情况

如果每 1kg 乙醚中约含 1mg 抗氧化剂,不影响使用。如乙醚中含有较高的抗氧化剂,例如:每千克中含有 7mg 抗氧化剂,此种醚仅用于常规测定,并且空白试验与样品测定要同时进行,以校正抗氧化剂残留物引起的系统误差。若用于基准法测定,使用前应重新蒸馏。

#### 8.5 乙醇

非甲醇变性乙醇只要不影响测定结果也可以使用。



## 附录 A

(标准的附录)

## 使用带虹吸管或洗瓶的抽脂管的操作步骤

若使用带虹吸管或洗瓶的抽脂管(见 4.6 注),步骤如下所述。

## A1 步骤

A1.1 样品的制备:见 5.1。

## A1.2 样品部分

处理过程如 5.2 所述,但要使用抽脂管(4.6)。

样品应尽快全部移入抽脂管底部。

A1.3 空白试验:见 5.3 和 8.2。

A1.4 脂肪收集瓶的准备:见 5.4。

## A1.5 测定

## A1.5.1 样品处理

A1.5.1.1 向样品中加入 10mL  $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  的水,将样品全部洗入抽脂管的底部,彻底混合。接 A1.5.2 步骤。

A1.5.1.2 见 5.5.1.2。

A1.5.2 加入 2mL 氨溶液(3.2)或同体积的氨溶液(3.2 注),与管底部已稀释的样品彻底混合。加入氨水后,应立即进行下步操作。

A1.5.3 将抽脂管放入  $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  的水浴(4.5)中,加热 15~20min,偶尔振荡样品管,然后冷却至室温。

A1.5.4 加入 10mL 乙醇(3.3),在管底部轻轻彻底地混合,必要时加入 2 滴刚果红溶液(3.4)。

A1.5.5 加入 25mL 乙醚(3.5),加软木塞(已被水饱和),或用水浸湿的其他瓶塞,上下反转 1min,不要过度(避免形成持久性乳化液)。必要时,将管子放入流动的水中冷却,然后小心地打开软木塞,用少量的混合溶剂(3.7)(使用洗瓶)(4.8)冲洗塞子和管颈,使冲洗液流入管中。

A1.5.6 加入 25mL 石油醚(3.6),加塞(塞子重新用水润湿),按 A1.5.4 所述轻轻振荡 30s。

A1.5.7 将加塞的管子放入离心机中,在 500~600r/min 下(3.2)离心 1~5min。如果没有离心机,则将管子放到支架(4.7)上,至少静止 30min,直到上层液澄清,并明显地与水相分离,必要时,将管子放入流水中冷却。

A1.5.8 小心地打开软木塞,用少量混合溶剂洗塞子和管颈,使冲洗液流入管中。

A1.5.9 将虹吸管或洗瓶接头插入管中,向下压长支管,直到距两相界面的上方 4mm 处,内部长支管应与管轴平行。

小心地将上层液移入含有沸石(4.10)的收集瓶中,也可用金属皿。避免移入任何水相。用少量混合溶剂冲洗长支管的出口,收集冲洗液于收集瓶中。

A1.5.10 松开管颈处的接头,用少量的混合溶剂冲洗接头和内部长支管的较低部分,重新插好接头,将冲洗液移入收集瓶中。

用少量的混合溶剂冲洗出口,冲洗液收集于瓶中,必要时,按 5.5.14 所述,通过蒸馏或蒸发去除部分溶剂。

A1.5.11 再松开管颈处的接头,微微抬高接头,加入 5mL 乙醇,用乙醇冲洗长支管,如 A1.5.4 所述混合。

A1.5.12 重复 A1.5.5~A1.5.10 步骤进行第二次抽提,但仅用 15mL(3.5)乙醇和 15mL 石油醚,抽

提之后,在移开管接头时,用乙醚冲洗内部长支管。

A1.5.13 重复 A1.5.5~A1.5.10 步骤,不加乙醇,进行第三次抽提,仅用 15mL(3.5)乙醇和 15mL 石油醚,

注:如果产品中脂肪的质量分数低于 5%,可省略第三次抽提。

A1.5.14 以下按 5.5.14~5.5.18 所述进行。

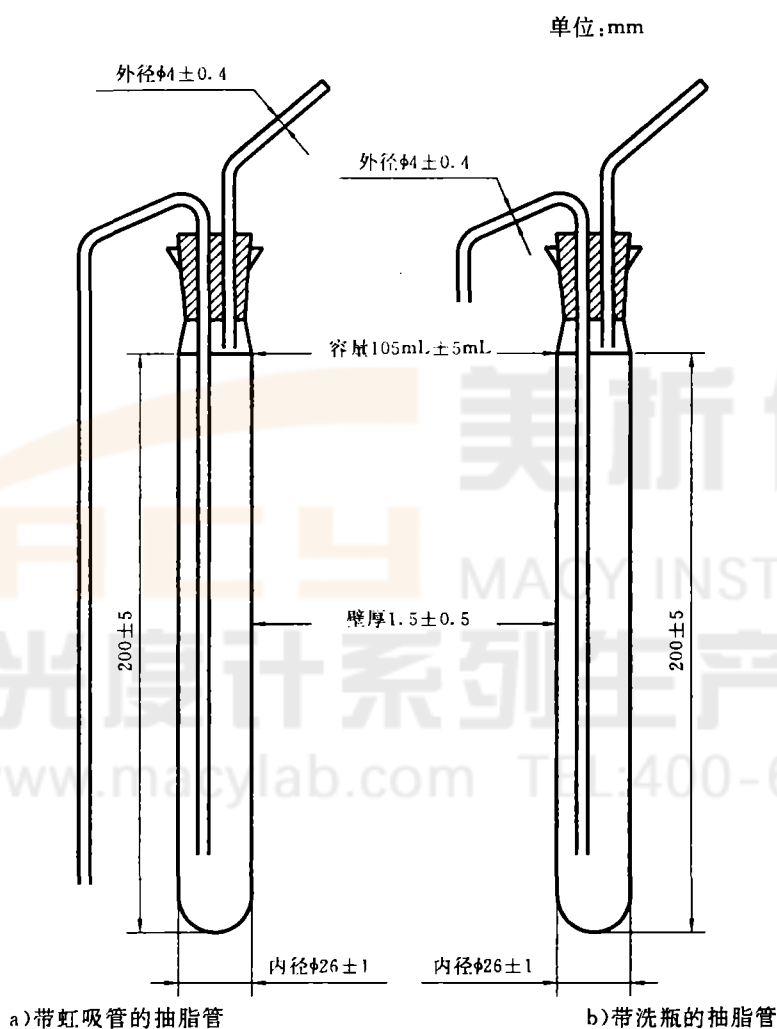


图 A1 抽脂管图例



GB/T 5413.3—1997

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-22803

定价: 10.00 元

## 前 言

以往亚油酸的测定方法测得的仅是脂肪酸甘油三酸酯的甲基化或丁基化衍生物,不包括游离的亚油酸含量。本标准给出的方法测得的是亚油酸的总量,样品处理较为简单,灵敏度高。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨金宝、王芸、王心祥。



婴幼儿配方食品和乳粉  
亚油酸的测定

GB/T 5413.4—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of linoleic acid content

## 1 范围

本标准规定了用气相色谱法测定亚油酸的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中亚油酸的测定。

## 2 方法提要

样品中游离的亚油酸和亚油酸甘油酯经皂化后均以盐类形式存在,在酸性条件下用正己烷萃取,经气相色谱与其他成分分离后,测定其含量。

## 3 试剂

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 石油醚:沸程 40℃~60℃。
- 3.2 正己烷:色谱纯。
- 3.3 乙醇:体积分数为 95%。
- 3.4 无水硫酸钠。
- 3.5 氢氧化钾溶液:质量比为 500:1000。
- 3.6 硫酸溶液:体积分数为 20%。
- 3.7 亚油酸标准溶液:浓度为每毫升正己烷含 1mg 亚油酸。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

- 4.1 分液漏斗:250mL。
- 4.2 旋转蒸发器。
- 4.3 气相色谱仪:带火焰离子化检测器。
- 4.4 色谱柱,1m×3mm,填充 GP10%(SP-216-PS, 100~120 目经 DMCS 处理的酸洗硅藻土载体(Supelcoport)填充剂,或同等性能的柱子。

## 5 操作步骤

5.1 准确称取 2.0g 样品,用 10mL 水移入 250mL 平底烧瓶中,加入 10mL 乙醇(3.3)、5mL 氢氧化钾溶液(3.5),回流 30min。在回流过程中应至少三次振摇烧瓶,以使样品完全皂化。迅速冷却至室温。

5.2 用硫酸溶液(3.6)调节皂化液至 pH<1.5,转移溶液至 250mL 分液漏斗中,用至少 20mL 水分几

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

次冲洗烧瓶,合并洗液于分液漏斗中。加入 25mL 正己烷(3.2),振摇 1min,静置分层,收集正己烷相,用正己烷萃取水相至少两次,每次用量 20mL。合并正己烷相。用无水硫酸钠柱(3.4)过滤正己烷到一个 100mL 容量瓶中,用少量正己烷冲洗柱子,定容。

### 5.3 气相色谱条件

柱温:195℃。

检测器温度:230℃。

进样器温度:250℃。

进样体积:2μL。

检测器:火焰离子化检测器。

氮气流速:20mL/min。

### 5.4 测定

分别注射 2μL 亚油酸标准溶液和样品溶液进入气相色谱仪中进行定性和定量测定。

### 6 分析结果的表述

$$\text{样品中亚油酸的含量(mg/100g)} = \frac{A_i \times C_s \times 100}{B_i \times m} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $A_i$ ——样品中亚油酸的峰面积;

$B_i$ ——标准溶液中亚油酸的峰面积;

$C_s$ ——亚油酸标准溶液浓度,mg/mL;

$m$ ——样品的质量,g。

### 7 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 5%。

## 前 言

食品中糖的测定,通常采用的是氧化还原滴定法,但在同时有其他还原糖存在的情况下,会对测定产生干扰。本标准给出了三种测定方法,其中方法之一高压液相色谱法和方法二酶比色法,避免了还原糖的干扰,而且,具有较高的准确度。方法一可以同时测定各种糖。方法三采用 GB/T 16286—1996 方法。考虑到传统的氧化还原滴定法在没有其他还原糖干扰的情况下,测定乳糖和蔗糖的准确度较高,而且所需仪器设备简单,多数实验室习惯于采用这种方法,因此,仍将“莱因-埃农氏法”(Lane and Eynor's Method)作为方法二给出。

本标准方法一为仲裁法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳制品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、杨金宝、李玉贤、王心祥。

婴幼儿配方食品和乳粉  
乳糖、蔗糖和总糖的测定

GB/T 5413.5—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of lactose, sucrose and total sugars contents

## 1 范围

本标准规定了用高压液相色谱法、莱因-埃农氏法和酶-比色法测定糖的方法。

本标准方法一适用于婴幼儿配方食品和乳粉中各种糖的测定；方法二适用于全脂乳粉、全脂加糖乳粉、脱脂乳粉和其他总糖中只含有乳糖、蔗糖的乳粉制品中乳糖、蔗糖和总糖的测定；方法三适用于婴幼儿配方食品和乳粉中蔗糖的测定。

## 2 引用标准

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 16286—1996 食品中蔗糖的测定方法 酶-比色法

### 方法一 高压液相色谱法

## 3 方法提要

婴幼儿食品中如含有多种糖，可利用高压液相色谱法的 $\mu$ -碳水化合物柱或氨基柱(Lichrosorb-NH<sub>2</sub>柱)，将它们分离，用示差折光检测器，检出各糖液的折光指数，此折光指数与其浓度成正比。

## 4 试剂

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。

4.1 澄清剂：硫酸铜，质量分数7%。氢氧化钠，质量分数4%。

4.2 乙腈。

4.3 标准溶液

4.3.1 标准糖贮备液，10mg/mL。

精确称取被测糖的试样1g，溶于水中，用水稀释至100mL容量瓶内，定容。

4.3.2 标准糖工作液，4mg/mL。

吸取4mL贮备液，置10mL容量瓶中，用乙腈稀释至刻度。

## 5 仪器

常用实验室仪器及：

5.1 高压液相色谱仪，带碳水化合物分析柱或氨基柱。

国家技术监督局1997-05-28批准

1998-09-01实施



## 6 操作步骤

### 6.1 样液制备

精确称取 2g 左右样品,加 30mL 水溶解,移至 100mL 容量瓶中,加澄清剂硫酸铜(4.1)10mL,氢氧化钠(4.1)4mL,振荡,加水至刻度,静置半小时,过滤。取 4mL 样品母液置 10mL 容量瓶用乙腈定容,通过 0.45 $\mu$ m 过滤器过滤,滤液备用。

### 6.2 高压液相色谱仪工作条件:

R401 示差折光检测器:

30cm $\times$ 4.6mm 内径——碳水化合物分析柱(夹套保温 20 $^{\circ}$ C)

流动相:乙腈/水=85/15

流动相流速:0.5mL/min

### 6.3 进样

在仪器稳定后,用注射器或进样阀注射 50 $\mu$ L 标准样液共 4 次,记下保留时间,测定峰高,放弃第一次数据,取后三者平均峰高值,同样进样 50 $\mu$ L 四次得出平均峰高。

## 7 分析结果的表述

$$\text{样品中糖含量(g/100g)} = \frac{C' \times H}{H' \times \frac{m}{100} \times \frac{4}{10} \times 1000} \times 100 = \frac{25C' \times H}{H' \times m} \dots\dots(1)$$

式中:  $C'$ ——标准糖溶液浓度,mg/mL;

$H$ ——样品中糖的平均峰高;

$H'$ ——标准糖溶液的峰高;

$m$ ——样品的质量,g。

注:如果需同时测定样品中所含其他糖类,可在标准糖溶液中加入各种糖 1g,进样如前,记下各种糖保留时间,按上列公式计算各值。

## 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 5%。

### 方法二 乳糖、蔗糖和总糖的测定(莱因-埃农氏法)

## 9 方法提要

乳糖:样品经除去蛋白质以后,在加热条件下,直接滴定已标定过的费林氏液,样品中的乳糖将费林氏液中的二价铜还原为氧化亚铜。以次甲基蓝为指示剂,在终点稍过量时,乳糖将蓝色的氧化型次甲基蓝还原为无色的还原型次甲基蓝。根据样液消耗的体积,计算乳糖含量。

蔗糖:样品除去蛋白质后,其中蔗糖经盐酸水解转化为具有还原能力的葡萄糖和果糖,再按还原糖测定。将水解前后转化糖的差值乘以相应的系数即为蔗糖含量。

总糖:乳糖和蔗糖之和。

## 10 试剂

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。

### 10.1 费林氏液(甲液和乙液)

10.1.1 甲液:取 34.639g 硫酸铜,溶于水,加入 0.5mL 浓硫酸,加水至 500mL。

- 10.1.2 乙液:取 173g 酒石酸钾钠及 50g 氢氧化钠溶解于水中,稀释至 500mL,静置两天后过滤。
- 10.2 次甲基蓝溶液:10g/L。
- 10.3 盐酸溶液:体积比 1:1。
- 10.4 酚酞溶液:0.5g 酚酞溶于 75mL 体积分数为 95% 的乙醇中,并加入 20mL 水,然后再加入约 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液,直到加入一滴立即变成粉红色,再加入水定容至 100mL。
- 10.5 氢氧化钠溶液:c(NaOH)为 300g/L。取 300g 氢氧化钠,溶于 1000mL 水中。
- 10.6 乙酸铅溶液:c(PbAc<sub>2</sub>)为 200g/L。取 20g 乙酸铅,溶解于 100mL 水中。
- 10.7 草酸钾-磷酸氢二钠溶液:取草酸钾 3g,磷酸氢二钠 7g,溶解于 100mL 水中。

## 11 仪器

常用理化实验室仪器。

## 12 操作步骤及结果计算

### 12.1 费林氏液的标定

#### 12.1.1 用乳糖标定

12.1.1.1 称取预先在 92~94℃ 烘箱中干燥 2h 的乳糖标样约 0.75g (准确到 0.2mg), 用水溶解并稀释至 250mL。将此乳糖溶液注入一个 50mL 滴定管中, 待滴定。

12.1.1.2 预滴定: 取 10mL 费林氏液(甲、乙液各 5mL)于 250mL 三角烧瓶中。再加入 20mL 蒸馏水, 从滴定管中放出 15mL 乳糖溶液于三角瓶中, 置于电炉上加热, 使其在 2min 内沸腾, 沸腾后关小火焰, 保持沸腾状态 15s, 加入 3 滴次甲基蓝溶液(10.2), 继续滴入乳糖溶液至蓝色完全褪尽为止, 读取所用乳糖的毫升数。

12.1.1.3 精确滴定: 另取 10mL 费林氏液(甲、乙液各 5mL)于 250mL 三角烧瓶中, 再加入 20mL 蒸馏水, 一次加入比预备滴定量少 0.5~1.0mL 的乳糖溶液, 置于电炉上, 使其在 2min 内沸腾, 沸腾后关小火焰, 维持沸腾状态 2min, 加入 3 滴次甲基蓝溶液, 然后继续滴入乳糖溶液(一滴一滴徐徐滴入), 待蓝色完全褪尽即为终点。以此滴定量作为计算的依据(在同时测定蔗糖时, 此即为转化前滴定量)。

12.1.1.4 按式(2)、(3)计算乳糖测定时, 费林氏液的乳糖校正值( $f_1$ ):

$$A_1 = \frac{V_1 \times m_1 \times 1000}{250} = 4 \times V_1 \times m_1 \dots\dots\dots(2)$$

$$f_1 = \frac{4 \times V_1 \times m_1}{AL_1} \dots\dots\dots(3)$$

式中:  $A_1$ ——实测乳糖数, mg;

$V_1$ ——滴定时消耗乳糖液量, mL;

$m_1$ ——称取乳糖的质量, g;

$AL_1$ ——由乳糖液滴定毫升数查表 1 所得的乳糖数, mg。

表1 乳糖及转化糖因数表(10mL 费林氏液)

滴定量,mL	乳糖,mg	转化糖,mg	滴定量,mL	乳糖,mg	转化糖,mg
15	68.3	50.5	33	67.8	51.7
16	68.2	50.6	34	67.9	51.7
17	68.2	50.7	35	67.9	51.8
18	68.1	50.8	36	67.9	51.8
19	68.1	50.8	37	67.9	51.9
20	68.0	50.9	38	67.9	51.9
21	68.0	51.0	39	67.9	52.0
22	68.0	51.0	40	67.9	52.0
23	67.9	51.1	41	68.0	52.1
24	67.9	51.2	42	68.0	52.1
25	67.9	51.2	43	68.0	52.2
26	67.9	51.3	44	68.0	52.2
27	67.8	51.4	45	68.1	52.3
28	67.8	51.4	46	68.1	52.3
29	67.8	51.5	47	68.2	52.4
30	67.8	51.5	48	68.2	52.4
31	67.8	51.6	49	68.2	52.5
32	67.8	51.6	50	68.3	52.5

注：“因数”系指与滴定量相对应的数目，可自表中查得。若蔗糖含量与乳糖含量的比超过3:1时，则在滴定量中加表2中的校正数后计算。

## 12.1.2 用蔗糖标定

12.1.2.1 称取在105℃烘箱中干燥2h的蔗糖约0.2g(准确到0.2mg)，用50mL水溶解并洗入100mL容量瓶中，加水10mL，再加入10mL盐酸(10.3)，置75℃水浴锅中，时时摇动，在2min30s至2min45s之间，使瓶内温度升至67℃。自达到67℃后继续在水浴中保持5min，于此时间内使其温度升至69.5℃，取出，用冷水冷却，当瓶内温度冷却至35℃时，加2滴甲基红指示剂(10.4)，用300g/L的氢氧化钠(10.5)中和至呈中性。冷却至20℃，用水稀释至刻度，摇匀。并在此温度下保温30min后再按12.1.1.2和12.1.1.3操作。得出滴定10mL费林氏液所消耗的转化糖量。

12.1.2.2 按式(4)、(5)计算蔗糖测定时，费林氏液的蔗糖校正值( $f_2$ )：

$$A_2 = \frac{V_2 \times m_2 \times 1000}{100 \times 0.95} = 10.5263 \times V_2 \times m_2 \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$f_2 = \frac{10.5263 \times V_2 \times m_2}{AL_2} \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中： $A_2$ ——实测转化糖量，mg；

$V_2$ ——滴定时消耗蔗糖液量，mL；

$m_2$ ——取称蔗糖的质量，g；

$AL_2$ ——由蔗糖液滴定毫升数查表1所得的转化糖量，mg。

## 12.2 乳糖的测定

## 12.2.1 样品处理

- 12.2.1.1 称取2.5~3g 样品(准确至0.01g),用100mL 水分数次溶解并洗入250mL 容量瓶中。
- 12.2.1.2 加4mL 乙酸铅(10.6)、4mL 草酸钾-磷酸氢二钠溶液,每次加入试剂时都要徐徐加入,并摇动容量瓶,用水稀释至刻度,静置数分钟,用干燥滤纸过滤,弃去最初25mL 滤液后,所得滤液作滴定用。
- 12.2.2 滴定
- 12.2.2.1 预滴定:将此滤液注入一个50mL 滴定管中,待测定。取10mL 费林氏液(甲、乙液各5mL)于250mL 三角烧瓶中,再加入20mL 蒸馏水,置于电炉上加热,使其在2min 内沸腾,沸腾后关小火焰,保持沸腾状态15s,加入3 滴次甲基蓝(10.2),然后徐徐滴入乳糖溶液至蓝色完全褪尽为止,读取所用乳糖的毫升数。
- 12.2.2.2 精确滴定:另取10mL 费林氏液(甲、乙各5mL)于250mL 三角烧瓶中,再加入20mL 蒸馏水,一次加入比预备滴定量少0.5~1.0mL 的乳糖溶液,置于电炉上,使其在2min 内沸腾,沸腾后关小火焰,维持沸腾状态2min,加入3 滴次甲基蓝溶液,然后一滴一滴徐徐滴入乳糖溶液,待蓝色完全褪尽即为终点。以此滴定量作为计算的依据(在同时测定蔗糖时,此即为转化后滴定量)。
- 12.2.3 乳糖含量的计算

$$L = \frac{F_1 \times f_1 \times 0.25 \times 100}{V_1 \times m} \quad \dots\dots\dots(6)$$

- 式中:  $L$ ——样品中乳糖的质量分数, g/100g;
- $F_1$ ——由消耗样液的毫升数查表1 所得乳糖数, mg;
- $f_1$ ——费林氏液乳糖校正值;
- $V_1$ ——滴定消耗滤液量, mL;
- $m$ ——样品的质量, g。

### 12.3 蔗糖的测定

#### 12.3.1 转化前转化糖量的计算

利用测定乳糖时的滴定量,自表1 中查出相对应的转化糖量,按式(7)计算:

$$\text{转化前转化糖质量分数}(\%) = \frac{F_2 \times f_2 \times 0.25 \times 100}{V_1 \times m} \quad \dots\dots\dots(7)$$

- 式中:  $F_2$ ——由测定乳糖时消耗样液的毫升数查表1 所得转化糖数, mg;
- $f_2$ ——费林氏液蔗糖校正值;
- $V_1$ ——滴定消耗滤液量, mL;
- $m$ ——样品的质量, g。

#### 12.3.2 样液的转化及滴定

取50mL 样液于100mL 容量瓶中,加水10mL,再加入10mL 的盐酸(10.3),置75℃水浴锅中,时时摇动,在2min30s 至2min45s 之间,使瓶内温度升至67℃。自达到67℃后继续在水浴中保持5min,于此时间内使其温度升至69.5℃,取出,用冷水冷却,当瓶内温度冷却至35℃时,加2 滴酚酞溶液剂(10.4),用氢氧化钠(10.5)中和至呈中性,冷却至20℃,用水稀释至刻度,摇匀。并在此温度下保温30min 后再按12.2.2 滴定,得出滴定10mL 费林氏液所消耗的转化液量。

$$\text{转化后转化糖质量分数}(\%) = \frac{F_2 \times f_2 \times 0.50 \times 100}{V_2 \times m} \quad \dots\dots\dots(8)$$

- 式中:  $F_2$ ——由  $V_2$  查得转化糖数, mg;
- $f_2$ ——费林氏液蔗糖校正值;
- $m$ ——样品的质量, g;
- $V_2$ ——滴定消耗的转化液量, mL。

#### 12.3.3 蔗糖含量的计算

$$\text{样品中蔗糖含量}(\text{g}/100\text{g}) = (L_1 - L_2) \times 0.95 \quad \dots\dots\dots(9)$$

式中： $L_1$ ——转化后转化糖的质量分数，%；

$L_2$ ——转化前转化糖的质量分数，%。

12.3.4 若样品中乳糖与蔗糖之比超过 3:1 时，则计算乳糖时应在滴定量中加上表 2 中的校正值数后再查表 1 和计算。

12.3.5 总糖=蔗糖+乳糖

### 13 允许差

#### 13.1 重复性

由同一分析人员在短时间间隔内测定的两个结果之间的差值，不应超过结果平均值的 1.5%。

#### 13.2 重现性

由不同实验室的两个分析人员对同一样品测得的两个结果之差，不应超过结果平均值的 2.5%。

表 2 乳糖滴定量校正值数

滴定终点时所用的糖液量 mL	用 10mL 费林氏液、蔗糖及乳糖量的比	
	3:1	6:1
15	0.15	0.30
20	0.25	0.50
25	0.30	0.60
30	0.35	0.70
35	0.40	0.80
40	0.45	0.90
45	0.50	0.95
50	0.55	1.05

### 方法三 蔗糖的测定——(酶比色法)

同 GB/T 16286。

GB/T 5413.6—1997

## 前 言

本标准直接采用 GB 12394—90《食品中不溶性膳食纤维的测定方法》方法。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准主要承办人：王芸、王心祥。



中华人民共和国国家标准

婴幼儿配方食品  
不溶性膳食纤维的测定

GB/T 5413.6—1997

Formula foods for infant and young children  
—Determination of insoluble dietary fiber

---

1 范围

本标准规定了不溶性膳食纤维的中性洗涤剂测定方法。  
本标准适用于婴幼儿配方食品中不溶性膳食纤维的测定。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 12394—90 食品中不溶性膳食纤维的测定方法

3 试剂、仪器、操作步骤、分析结果的表述

见 GB 12394。

## 前 言

本标准仅对 GB 5413—85 中 A. 4 章乳粉中灰分的测定的文本格式进行了修改,内容未做改动。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、黄敏、周红。





婴幼儿配方食品和乳粉  
灰分的测定

GB/T 5413.7—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of ash

1 范围

本标准规定了灰分测定的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中灰分的测定。

2 方法提要

样品于600℃以下灼热、灰化所得的残留物的质量,即为样品的灰分,以质量分数表示。

3 仪器

常用实验室仪器及:

3.1 分析天平。

3.2 瓷坩埚:40~60mL。用清水清洗后,再用王水浸泡1h,洗去酸液,置电炉上烧灼0.5h,取出,称量,待用。

3.3 电炉。

3.4 高温炉:保持温度550℃左右。

3.5 干燥器:装有有效干燥剂。

3.6 坩埚夹。

4 操作步骤

4.1 称取约3~5g样品(准确到0.2mg)于已准备好并已称量的坩埚中,置于电炉上初步灼烧,使之炭化至无烟。

4.2 移入高温炉维持温度在550℃左右,灼烧,使之成白灰(约2h)后,冷至100~200℃后取出,放入干燥器中冷却至室温(约30min),称量。

4.3 重复4.2操作,直至前后两次质量差不超过2mg。

5 结果表示

$$\text{样品中的灰分(\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $m_1$ ——空坩埚的质量,g;

$m_2$ ——样品的质量,g;

$m_3$ ——坩埚加样品灰化后的质量,g。

国家技术监督局1997-05-28批准

1998-09-01实施

结果精确至 0.01%。

## 6 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 0.05%。

---

MACY 美析仪器  
MACY INSTRUMENTS  
专业光度计系列生产厂家  
TP://www.macylab.com TEL:400-616-46

## 前 言

本标准等同采用国际乳品联合会标准 IDF 26A:1993《乳粉和稀奶油粉——水分的测定》。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、黄敏、张春燕。



Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of the water content

1 范围

本标准规定了水分的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中水分的测定。

2 方法原理

将样品放入  $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  的烘箱中加热,直至恒量,所失去的质量即为水分含量。

3 仪器

常用实验室仪器及:

- 3.1 分析天平:灵敏度为 0.1mg。
- 3.2 适当的皿:最好是铝、镍、不锈钢或玻璃皿,配有移动盖,直径为 50-70mm,高度为 25mm。
- 3.3 干燥器:配有有效干燥剂。
- 3.4 鼓风式烘箱:可控制恒温在  $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,烘箱中的温度应均匀。
- 3.5 带密封盖的瓶子:用于混合乳粉。

4 操作步骤

4.1 样品的制备

将样品全部移入两倍于样品体积的干燥、带盖的瓶中,旋转振荡,使之充分混合(在此步骤中,不可能得到完全均匀的样品,必须在样品瓶中的相距较远的两点,取两份样品,平行分析)。

4.2 测定

- 4.2.1 将皿和盖(不要放在皿上)放入  $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  的烘箱中,加热 1h,加盖,然后将皿移入干燥器中,冷却至室温,称量。
- 4.2.2 将约 3~5g 样品放入皿中,加盖,迅速准确称量。
- 4.2.3 将皿和盖(不要放在皿上)放入  $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  的烘箱中,加热 3h。
- 4.2.4 加盖,将皿移入干燥器中,冷却至室温,并迅速准确地称量。
- 4.2.5 再将皿和盖(不要放在皿上)放入  $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  的烘箱中,加热 1h。加盖后移入干燥器中,冷却至室温,迅速称量。
- 4.2.6 重复上述操作,直到两次连续称量质量之差不超过 0.0005g。

## 5 结果表示

$$\text{样品的水分含量(\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中： $m_1$ ——加入样品后皿和盖的最初质量，g；

$m_2$ ——样品烘干后两次称量获得的较小的质量，g；

$m_3$ ——样品的质量，g。

## 6 允许差

两次测得结果的最大偏差不得超过 0.05%。

## 前 言

测定维生素 A、D、E 的方法很多,但广为采用的是高压液相色谱法,方法快速、准确,并避免了三种成分的相互干扰。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨金宝、王芸。



婴幼儿配方食品和乳粉  
维生素A、D、E的测定

GB/T 5413.9—1997

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin A,D,E content

1 范围

本标准规定了用液相色谱法测定维生素A、D、E的方法。

本标准适用于各种婴幼儿配方食品和乳粉中维生素A、D、E的测定。

2 方法提要

样品中脂溶性维生素在皂化过程中与脂肪分离,经(用)石油醚萃取后,用高压液相色谱,紫外检测器定量测定。

3 试剂

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 高峰氏淀粉酶(Taka-Diastase)。

3.2 异丙醇:色谱纯。

3.3 焦性没食子酸的乙醇溶液:15g/L。

3.4 氢氧化钾溶液:质量比为100:50。

3.5 石油醚:沸程30~60℃。

3.6 甲醇:色谱纯。

3.7 正己烷:色谱纯。

3.8 环己烷:色谱纯。

3.9 维生素A、E标准溶液

3.9.1 维生素A标准贮备液,含维生素A100μg/mL的甲醇溶液。

称取10mg的维生素A,用甲醇定容于100mL容量瓶中。

3.9.2 维生素E标准贮备液,含维生素E400μg/mL的甲醇溶液。

称取40mg的维生素E,用甲醇定容于100mL容量瓶中。

3.9.3 维生素A、E标准工作液,其中维生素A的浓度为2μg/mL,维生素E的浓度为20μg/mL。

取1mL维生素A标准贮备液(3.9.1)和2.5mL维生素E标准贮备液(3.9.2)于50mL容量瓶中,用甲醇溶解。

3.10 维生素D标准溶液

3.10.1 维生素D<sub>2</sub>标准贮备液,含维生素D<sub>2</sub>100μg/mL的甲醇溶液。

称取10mg的维生素D<sub>2</sub>,用甲醇定容于100mL容量瓶中。

3.10.2 维生素D<sub>3</sub>标准贮备液,含维生素D<sub>3</sub>100μg/mL的甲醇溶液。

国家技术监督局1997-05-28批准

1998-09-01实施

称取 10mg 的维生素 D<sub>3</sub>,用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。

### 3.10.3 维生素 D 标准工作液,其中维生素 D<sub>2</sub>、维生素 D<sub>3</sub>的质量浓度均为 1μg/mL。

取维生素 D<sub>2</sub>标准贮备液 1mL,维生素 D<sub>3</sub>标准贮备液 1mL 于 100mL 容量瓶中,用甲醇定容。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 平底烧瓶:250mL。

4.2 分液漏斗:500mL。

4.3 旋转蒸发器。

4.4 高压液相色谱仪:具有可变波长的紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

#### 5.1.1 含淀粉的样品

准确称取 10g 样品,放入 250mL 平底烧瓶中,加入 1gTaka 淀粉酶(3.1),再加入 30mL45~50℃的蒸馏水,混合均匀后,用氮气排除瓶中空气,盖上瓶塞,置 45℃烘箱内 30min。

#### 5.1.2 不含淀粉的样品

准确称取 10g 样品,置于 250mL 平底烧瓶中,加 30mL 蒸馏水。

### 5.2 测定液的制备

5.2.1 于上述处理过的样品溶液中加入 100mL 的没食子酸乙醇溶液(3.3),充分混匀后加 50mL 氢氧化钾溶液(3.4),在蒸汽浴上连续回流 30min 后,立刻冷却到室温。

5.2.2 将皂化液转入一 500mL 分液漏斗中,用 100mL 水分几次冲洗平底烧瓶,洗涤液并入分液漏斗中。

5.2.3 于上述分液漏斗中,加入 100mL 石油醚(3.5),盖好瓶塞,倒置分液漏斗并剧烈振摇 1min。在振摇过程中,注意释放瓶内压力。静置分层,将水相放入另一 500mL 分液漏斗中。重复上述萃取过程二次,合并醚液到第一个分液漏斗中。用蒸馏水洗该醚液至中性,通过无水硫酸钠过滤干燥,在 40℃和氮气流下,于旋转蒸发器上蒸至近干(绝不允许蒸干)后,用石油醚转移至 10mL 容量瓶中,定容。

5.2.4 从上述容量瓶中取 2mL 石油醚溶液放入试管 A 中,再取 7mL 石油醚溶液放入另一试管 B 中,分别用氮气将试管 A 和 B 中的石油醚吹干,石油醚溶液放于 A 中加 5mL 甲醇,用来测定维生素 A、E,试管 B 中加 1mL 正己烷,用来测定维生素 D。

### 5.3 测定

#### 5.3.1 维生素 A 和 E 的测定

##### 5.3.1.1 仪器条件

色谱柱: 25cm×4.6mm,ODS 柱或具等同性能的色谱柱。

流动相:甲醇。

流速:1.0mL/min。

灵敏度:0.005AU/MV。

波长:维生素 A,325nm;维生素 E,290nm。

5.3.1.2 注射 50μL 维生素 A、E 标样(3.9.3)和 50μL 样品溶液(5.2.4 试管 A 中),得到标样和样品溶液中维生素 A 和 E 的峰高或峰面积。

#### 5.3.2 维生素 D 的测定

##### 5.3.2.1 测定液的制备

###### a) 仪器条件



色谱柱:30cm×4mm,硅胶柱。

流动相:环己烷(3.7)与正己烷(3.8)按体积比1:1混合,并按体积分数0.8%加入异丙醇(3.2)。

流速:1mL/min。

波长:265nm。

柱温:20℃。

灵敏度:0.005AU/MV。

注射体积:200μL。

b) 注射50μL维生素D标样和200μL样品溶液(试管B中),根据维生素D标样保留时间收集维生素D于试管C中,将试管C用氮气吹干,准确加入0.2mL甲醇(3.6)溶解。

### 5.3.2.2 测定步骤

#### a) 仪器条件

色谱柱:25cm×4.6mm,C<sub>18</sub>或具等同性能的色谱柱。

流动相:甲醇。

流速:1mL/min。

柱温:20℃。

波长:265nm。

灵敏度:0.005AU/MU。

注射体积:50μL。

b) 注射50μL维生素D标准溶液(3.10.3),注射50μL样品溶液(试管C中),得到标样和样品溶液中维生素D峰面积或峰高。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 A (IU/100g)} = \frac{c_s \times 10/2 \times 5 \times 3.33 \times 100}{m} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{样品中维生素 E (IU/100g)} = \frac{c_s \times 10/2 \times 5 \times 100}{m} \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{样品中维生素 D (IU/100g)} = \frac{c_s \times 10/75 \times 100 \times 40}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

$$c_s = \frac{A_s}{A_{sd}} \times c_{sd} \dots\dots\dots (4)$$

式中:  $c_s$ ——进样液中维生素A、E或D的质量浓度,μg/mL;

$m$ ——样品的质量,g;

$A_s$ ——进样液中维生素A、E或D的峰高(或峰面积);

$A_{sd}$ ——标样中维生素A、E或D的峰高(或峰面积);

$c_{sd}$ ——标样中维生素A、E或D的质量浓度,μg/mL。

计算结果精确至小数点后一位。

## 7 允许差

同一样品的两次测定值之差,维生素A不得超过两次测定平均值的5%;维生素D不得超过两次测定平均值的10%;维生素E不得超过两次测定平均值的5%。

## 前 言

在婴幼儿配方食品和乳粉中维生素  $K_1$  的含量较低,且在碱性条件下易分解。本标准给出的反相高压液相色谱法,是在参考了大量国内外文献的基础上,经过反复实验而确定的,解决了上述问题,方法快速、准确。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨金宝、王芸、王心祥。



婴幼儿配方食品和乳粉  
维生素 K<sub>1</sub> 的测定

GB/T 5413.10—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin K<sub>1</sub> content

1 范围

本标准规定了用液相色谱法测定维生素 K<sub>1</sub> 的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中维生素 K<sub>1</sub> 的测定。

2 方法提要

样品经酶水解后,用石油醚萃取,蒸发溶剂,浓缩后的样品进行高压液相色谱测定,以乙腈-甲醇-水为流动相,UV 检测器,于 270nm 波长下,定量维生素 K<sub>1</sub>。

3 试剂

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 高峰氏淀粉酶(Taka-Diastase)。

3.2 磷酸缓冲溶液,pH=7.8。

溶解 2.78g 磷酸二氢钠和 25.6g 磷酸氢二钠在 1L 水中。

3.3 脂酶:每毫克蛋白不得少于 2300 单位。

3.4 氢氧化钠溶液:c(NaOH)为 10mol/L。溶解 400g 氢氧化钠颗粒在 1L 水中。

3.5 氯化钠溶液:饱和。

3.6 乙醇:体积分数为 95%。

3.7 石油醚。

3.8 无水硫酸钠。

3.9 正己烷:色谱纯。

3.10 乙腈:色谱纯。

3.11 甲醇:色谱纯。

3.12 水:色谱纯。

3.13 标准溶液

3.13.1 标准贮备液:浓度为 2.5mg/mL。

准确地称取 25mg 维生素 K<sub>1</sub> 于 10mL 容量瓶中,用正己烷定容。

3.13.2 标准工作溶液,浓度为 0.25mg/mL。

吸取 1mL 标准贮备液于 10mL 容量瓶中,用正己烷定容。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

- 4.1 分液漏斗:500mL。
- 4.2 旋转蒸发器。
- 4.3 恒温水浴振荡器。
- 4.4 高压液相色谱仪:带紫外检测器。
- 4.5 色谱柱:25cm×4.6mm,C<sub>18</sub>或具同等性能的色谱柱。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

#### 5.1.1 含淀粉的样品

准确称取 10g 样品,放入 500mL 平底烧瓶中,加入 1gTaka 淀粉酶(3.1),再加入 50mL45~50℃的蒸馏水,混合均匀后,用氮气排除瓶中空气,盖上瓶塞,置 45℃烘箱内 30min。

#### 5.1.2 不含淀粉的样品

准确称取 10g 样品于 500mL 三角瓶中,加入 75mL 水,均质。

### 5.2 测定液的制备

5.2.1 于上述处理过的样品溶液中加入 50mL 磷酸缓冲溶液(3.2)和 1.5~2.0g 脂酶(3.3),于 37℃ 水浴上连续振荡 1h。

5.2.2 取出,加入 5mL 氢氧化钠溶液(3.4)。

5.2.3 定量地转移上述溶液于一个 500mL 分液漏斗中,加入 25mL 饱和氯化钠溶液(3.5)和 50mL 乙醇(3.6),充分混合。

5.2.4 加入 100mL 石油醚(3.7),加塞振摇 2min。小心地去掉塞子,加入另外 50mL 乙醇(3.6),静置分层,上层为有机相,中层为脂肪酸层,下层为水相。

5.2.5 放出水相和脂肪酸层于另一个 500mL 分液漏斗中。再次用 100mL 石油醚(3.7)萃取,静置分层,弃去水相,合并醚相。

5.2.6 用蒸馏水洗涤石油醚相,直到醚相为中性。

5.2.7 将石油醚通过无水硫酸钠(3.8)进入到一个 500mL 平底烧瓶中,在旋转蒸发器上 50℃下蒸发石油醚至近干。

5.2.8 用石油醚(3.7)转移残留物到一个 10mL 试管中,用氮气吹干。准确加入 1mL 正己烷,充分振荡溶解残留物,得到待测溶液。

注

- 1 样品中的脂肪小于 4g 时,用此量脂酶;如大于 4g,可多加一些脂酶,以使脂肪水解完全。
- 2 最后制备的样品必须放在冰箱中冷却,以析出脂肪酸。
- 3 在分层后,必须小心地放出水相及脂肪酸层,否则会增加样品的干扰物质。

### 5.3 色谱分析条件

流动相:乙腈:甲醇:水=70:22:8。

流速:2.0mL/min。

柱温:40℃。

检测器波长:270nm。

记录纸速度:0.5cm/min。

进样体积:25μL。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 K}_1 \text{ 含量 (mg/100g)} = \frac{(H_s/H_B) \times c_B}{m_s \times V_s} \dots\dots\dots(1)$$

式中： $H_s$ ——样品中维生素  $K_1$  峰高；

$H_B$ ——标准工作液中维生素  $K_1$  峰高；

$c_B$ ——标准工作液维生素  $K_1$  的质量浓度,mg/mL；

$V_s$ ——样品体积,mL；

$m_s$ ——样品的质量,g。

## 7 允许差

两次测得结果的最大偏差不得超过含量的 10%。



## 前 言

本标准给出两种方法,方法一是荧光法,重现性好,准确度较高。方法二是高压液相色谱法,测定速度快。

本标准方法一为仲裁法

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心、浙江省轻工业研究所。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:李茂胜、任一平、黄百芬、郎昭斌、陈青俊、王芸。

美析

MACY

MACY INST

光度计系列生产

www.macylab.com TEL:400-6

# 婴幼儿配方食品和乳粉 维生素B<sub>1</sub>的测定

GB/T 5413.11—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin B<sub>1</sub> content

## 1 范围

本标准规定了用荧光法和反相高压液相色谱法测定维生素B<sub>1</sub>的方法。

本标准方法一适用于乳粉中维生素B<sub>1</sub>的测定,方法二适用于婴幼儿配方食品和乳粉中维生素B<sub>1</sub>的测定。

### 方法一 荧光法

## 2 方法原理

样品在稀盐酸溶液中消化,过滤,除去蛋白质等物质。如果样品中维生素B<sub>1</sub>系游离态,可直接在碱性铁氰化钾中氧化成喋啉色素,在紫外光照射下发出荧光,其荧光强弱与喋啉色素成正比;如果维生素B<sub>1</sub>系结合态,则须经酶解转为游离态,层析除去杂质后再作荧光检测。检测所使用的激发波长E<sub>1</sub>为365nm,发射波长E<sub>2</sub>为435nm。

## 3 试剂

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 盐酸;c(HCl)为0.1mol/L。
- 3.2 氢氧化钠;c(NaOH)为150g/L。
- 3.3 异丁醇;重蒸馏。
- 3.4 乙酸钠;c(NaAc)为2mol/L。
- 3.5 酸性乙醇;体积分数为20%。用盐酸调节pH为3.5~4.3。
- 3.6 淀粉酶(生化试剂)溶液;100g/L。
- 3.7 中性氯化钾;c(KCl)为250g/L。250g 氯化钾溶于1000mL水中。
- 3.8 酸性氯化钾;c(KCl)为250g/L。加8.5mL 盐酸于1L 中性氯化钾溶液中。
- 3.9 铁氰化钾;c[K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]为10g/L,使用当天配制。
- 3.10 氧化剂。
- 3.11 标准溶液
- 3.11.1 维生素B<sub>1</sub>标准贮备液,浓度为100μg/mL。

准确称取50.0mg(在五氧化二磷干燥器内至恒量的)分析纯维生素B<sub>1</sub>盐酸盐,溶解于400mL左右体积分数为20%的酸性乙醇溶液(3.5)中,并定容于500mL棕色容量瓶中,于10℃左右贮存。

取4毫升10g/L的铁氰化钾(3.9),用150g/L的氢氧化钠溶液(3.2)稀释至100mL,配好后置于暗

国家技术监督局1997-05-28批准

1998-09-01实施

处4h内使用。

3.11.2 维生素B<sub>1</sub>标准工作液,浓度为3 $\mu$ g/mL。

吸取上述标准贮备液3mL,用0.1mol/L盐酸(3.1)稀释至100mL,每次实验须新鲜配制。

3.12 乙酸,体积分数为3%~5%。

将30mL冰乙酸用水稀释至1000mL。

3.13 活化人造沸石,40~60目,化学纯。

沸石的活化:称取100g人造沸石于大烧杯中,加十倍体积的热乙酸(3.12),在搅动下煮沸15min,待澄清后弃去乙酸溶液,如此重复三次,再加五倍体积的热酸性氯化钾溶液(3.8),于搅拌下煮沸15min,待澄清后弃去氯化钾溶液,重复三次,然后再用热水洗至无氯离子存在,用布氏漏斗抽滤,于100℃烘箱干燥,保存于不漏气的广口瓶中。

#### 4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 荧光分光光度计。

#### 5 操作步骤

##### 5.1 抽提

于150mL三角瓶中准确称取3g左右样品,加盐酸(3.1)50mL,用铝箔纸盖住瓶口,在137.2~161.7kPa压力下(125℃)消化半小时,同时吸取5mL标准工作液(3.11.2)于150mL三角瓶中,加入约50mL盐酸(3.1),在137.2~161.7kPa压力(125℃)下消化半小时,冷却后,用乙酸(3.4)调pH值为4.5,然后加5mL酶溶液(3.6),在37℃条件下保温过夜,冷却后调节pH为3.5,于100mL容量瓶中加入水定容,过滤。

##### 5.2 层析

5.2.1 称2g左右经活化的人造沸石(3.13),湿法装柱。

5.2.2 吸取10mL滤液,通过沸石柱层析,流速控制在 $\leq$ 0.5mL/min,弃去滤液。

5.2.3 用近沸的蒸馏水洗涤沸石三次,每次5mL,再用70~80℃的酸性氯化钾(4.8)洗柱五次,每次4~4.5mL,弃去初滤液1mL,集合滤液于25mL容量瓶中,冷却,用酸性氯化钾溶液(4.8)稀释至刻度。

##### 5.3 氧化

在四支50mL的试管中,分别加入1.5g氯化钠或氯化钾固体及5mL标样(5.2.3),在其中二个试管中,立即加入3mL氧化剂(3.9),混匀,立即加入13mL异丁醇(3.3),猛烈振荡15s以上,静置分层,待荧光测定,另二管不加氧化剂,以3mL的氢氧化钠(3.2)代替,作为空白。

同时吸取样液5mL(5.2.3)于另四支试管中,作法同上。

##### 5.4 荧光测定

从每一试管中吸上层清液作荧光测定。

#### 6 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素B}_1(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{(I_s - I_0) \times c \times 5}{(I_m - I_{m0}) \times m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots(1)$$

式中:  $I_s$ —样品荧光值;

$I_0$ —样品空白荧光值;

$I_m$ —标样荧光值;

$I_{m0}$ —标样空白荧光值;

$c$ —标样浓度, $\mu$ g/mL;



$m$ ——样品的质量, g。

## 7 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的5%。

## 方法二 反相高压液相色谱法

## 8 方法提要

样品在稀盐酸环境中高温水解、酶解, 样液用碱性铁氰化钾衍生, 正丁烷萃取后, 经 ODS  $C_{18}$  反相色谱柱分离, 在荧光检测器( $E_x$ : 375nm,  $E_m$ : 435nm)条件下检测, 用外标法定量维生素  $B_1$  的含量。

## 9 试剂

9.1 正丁醇。

9.2 铁氰化钾。

9.3 浓盐酸。

9.4 无水乙酸钠。

9.5 冰乙酸。

9.6 甲醇; 色谱纯。

9.7 硫胺素(维生素  $B_1$ ); 标准品。

9.8 铁氰化钾溶液:  $c[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  为 10g/L。称取 2g 铁氰化钾, 溶解并稀释至 200mL。

9.9 氢氧化钠溶液:  $c(\text{NaOH})$  为 100g/L。称取 20g 氢氧化钠固体, 溶解并稀释至 200mL。

9.10 碱性铁氰化钾溶液: 10g/L 铁氰化钾溶液(9.8)5mL 与 100g/L 氢氧化钠溶液(9.9)200mL 混合。

9.11 盐酸溶液:  $c(\text{HCl})$  为 0.1 mol/L。吸取 4.5mL 浓盐酸, 溶于 500mL 去离子水。

9.12 盐酸溶液:  $c(\text{HCl})$  为 0.01mol/L。吸上述 0.1 mol/L 盐酸溶液 50mL 配制成 500mL。

9.13 乙酸钠溶液( $\text{pH}=4.5$ ):  $c(\text{NaAc})$  为 0.05mol/L。称取 4.10g 乙酸钠固体, 配成 1000mL, 并用冰乙酸调至  $\text{pH}=4.5$ 。

9.14 乙酸钠溶液:  $c(\text{NaAc})$  为 2.0mol/L。称取 16.61g 乙酸钠, 配制成 100mL。

9.15 混合酶溶液, 30g/L。称取淀粉酶和木瓜酶各 3.6g, 溶于 100mL 2mol/L 乙酸钠溶液。

9.16 流动相配制: 用 0.05 mol/L 乙酸钠溶液与甲醇按适当比例混合。

9.17 标准溶液

9.17.1 维生素  $B_1$  标准储备溶液, 浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精确称取 0.0500g 维生素  $B_1$ (9.7), 用 0.01 mol/L 盐酸(9.11)溶解并定容于 100mL 容量瓶中, 放冰箱中保存。

9.17.2 维生素  $B_1$  标准工作液, 浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

将标准储备液用重蒸水稀释 1000 倍, 所得溶液经 0.3 $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

## 10 仪器

10.1 高效液相色谱仪或具同等性能的高效液相色谱仪。

10.2 荧光分光仪(带 9 $\mu\text{L}$  流动池)或具波长可调功能的等同性能荧光检测器。

10.3  $C_{18}$  反相色谱柱( $d_p$  5 $\mu\text{m}$ , 25cm  $\times$  4.6mm)或具同等性能的色谱柱。

10.4 组织捣碎机(10000~12000r/min)。

10.5 高压杀菌锅。

## 11 操作步骤

## 11.1 样品处理

11.1.1 称样:将样品放入捣碎机中捣碎后,精确称取 5.0~10.0g(内含维生素 B<sub>1</sub> 5μg 以上)于三角瓶中。

11.1.2 水解:加适量的盐酸溶液(9.11),控制样液中酸浓度在 0.1 mol/L 左右,将三角瓶内的样液摇匀后,放入高压杀菌锅内,在 121℃ 下保持 30 min,待冷却后取出,轻摇数次。

11.1.3 酶解:冷却至 40℃ 以下,分别加入 2.5mL 混合酶液(9.15),摇匀后,置于 37℃ 的培养箱中过夜。

11.1.4 定容:用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.0 左右,再用二次重蒸水定容至 100mL。

11.1.5 过滤:样液经定量滤纸过滤。

11.1.6 衍生:取滤液 10.00mL(11.1.5)于 25mL 带塞量筒中,加入 5mL 碱性铁氰化钾(9.10)氧化后,充分混匀后再加 10.00mL 正丁醇(9.1)萃取,经强烈摇动,静止分层后吸取正丁醇相(上层)进样。

## 11.2 样品测定

## 11.2.1 色谱条件

流动相:0.05 mol/L 乙酸钠溶液(9.13):甲醇(9.6)(65:35,体积比)。

流速:1.00 mL/min。

检测波长:激发波长 375nm,发射波长 435nm。

进样量:20 μL。

## 12 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 B}_1\text{的含量(mg/100g)} = \frac{c \times F \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:  $c$ ——进样样液的浓度,μg/mL;

$F$ ——稀释倍数;

$V$ ——定容容积,mL;

$m$ ——样品的质量,g。

## 13 允许差

## 13.1 重复性

同一样品两次测定结果之差不得超过平均值的 5%。

## 13.2 重现性

同一样品在两个不同实验室测定结果之差不得超过平均值的 5%。

## 前 言

本标准给出两种方法,方法一是荧光法,重现性好,准确度高。方法二是高压液相色谱法,测定速度快。

本标准方法一为仲裁法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心、浙江省轻工业研究所。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:李茂胜、任一平、黄百芬、郎昭斌、陈青俊、王芸。



婴幼儿配方食品和乳粉  
维生素 B<sub>2</sub> 的测定

GB/T 5413.12—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin B<sub>2</sub> content

1 范围

本标准规定了用荧光法和高压液相色谱法测定维生素 B<sub>2</sub> 的方法。

本标准方法一适用于乳粉中维生素 B<sub>2</sub> 含量的测定；方法二适用于婴幼儿配方食品和乳粉中维生素 B<sub>2</sub> 的测定。

方法一 荧光法

2 方法提要

样品在稀盐酸溶液中经消化，调整 pH 值，过滤，除去蛋白质等物质后，滤液加高锰酸钾氧化除去干扰物，此溶液中维生素 B<sub>2</sub> 在激发波长 440nm、发射波长 565nm 下可产生最大荧光强度，与标准样品做对照试验，可得维生素 B<sub>2</sub> 含量。

3 试剂

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 盐酸： $c(\text{HCl})$  为 0.1mol/L。

3.2 氢氧化钠： $c(\text{NaOH})$  为 400g/L。

3.3 冰乙酸。

3.4 高锰酸钾： $c(\text{KMnO}_4)$  为 40g/L。

3.5 过氧化氢：体积分数为 3%。

3.6 连二亚硫酸钠 ( $\text{NaS}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。

3.7 维生素 B<sub>2</sub> 标准溶液

3.7.1 维生素 B<sub>2</sub> 标准贮备液，浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

准确称取于暗处五氧化二磷条件下干燥过夜的维生素 B<sub>2</sub> 50.0mg，溶于 0.02mol/L 的乙酸中，定容至 500mL，甲苯条件下于冰箱中保存。

3.7.2 维生素 B<sub>2</sub> 标准中间液，浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

用 0.02mol/L 乙酸稀释 100mL 标准贮备液至 1000mL，在甲苯条件下于冰箱中保存。

3.7.3 标准工作液，维生素 B<sub>2</sub> 的浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

用水稀释 10mL 标准中间液至 100mL。当天配制。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

### 4.1 荧光分光光度计。

## 5 操作步骤

### 5.1 抽提

于 150mL 三角瓶中准确称取 5g 左右样品,加入盐酸(3.1)60mL,用铝箔纸盖住瓶口,在 137.2~161.7kPa 压力下(125℃)消化 30min 后用氢氧化钠(3.2)调节 pH 至 5.8,再用盐酸(3.1)调节 pH 至 4.5,将此抽提液移入 100mL 容量瓶中以蒸馏水定容,过滤,吸取 25mL 滤液于 250mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。

### 5.2 抽提液的氧化

5.2.1 吸取 4 份样品抽提液(5.1),每份 10mL,于 4 个试管中。

5.2.2 于其中二个试管各加 1mL 标准工作液(3.7.3)。

5.2.3 于另外二个试管中各加 1mL 水。

5.2.4 加 1mL 冰乙酸(3.3)于每一试管中,混匀。

5.2.5 加高锰酸钾溶液(3.4)0.5mL 于每个试管中,混匀。

5.2.6 2min 后各加过氧化氢(3.5)0.5mL,混匀,使其褪色。

### 5.3 荧光测定

依次测定每管荧光强度,激发波长 440nm,发射波长 565nm。

样液管(未加标准工作液者)经荧光测定后,各加 20mg 连二亚硫酸钠(3.6)混匀,立即测定荧光,在 5s 内读数。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 B}_2 \text{ 含量(mg/100g)} = \frac{(I_s - I_b) \times c \times D}{(I_{ss} - I_s) \times 10 \times m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots(1)$$

式中:  $I_b$ ——空白样品荧光值;

$I_s$ ——样品荧光值;

$I_{ss}$ ——样品加标样荧光值;

$c$ ——标样质量浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

$D$ ——样品稀释倍数;

$m$ ——样品的质量,  $\text{g}$ 。

注:  $\frac{I_s - I_b}{I_{ss} - I_s}$  值必须在 0.66~1.5 之间。

## 7 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 5%。

### 方法二 高压液相色谱法

## 8 方法提要

样品在稀盐酸环境中高温水解、酶解,经 ODS  $C_{18}$  反相色谱柱分离,在荧光检测器( $E_x$ : 462,  $E_m$ : 522nm)中检测,用外标法定量维生素  $B_2$  的含量。

## 9 试剂

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。

- 9.1 浓盐酸。
- 9.2 无水乙酸钠。
- 9.3 冰乙酸。
- 9.4 甲醇:色谱纯。
- 9.5 核黄素(维生素 B<sub>2</sub>):标准品。
- 9.6 盐酸溶液:c(HCl)为 0.1 mol/L。吸取 4.5mL 浓盐酸,溶于 500mL 去离子水。
- 9.7 盐酸溶液:c(HCl)为 0.01 mol/L。吸取上述 0.1 mol/L 盐酸 50mL,配制成 500mL。
- 9.8 乙酸钠溶液(pH=4.5):c(NaAc)为 0.05 mol/L。称取 4.10g 乙酸钠固体,配成 1000mL,并用冰乙酸调至 pH=4.5。
- 9.9 乙酸钠溶液:c(NaAc)为 2.0mol/L。称取 16.61g 乙酸钠,配制成 100mL。
- 9.10 混合酶溶液:30g/L。称取淀粉酶和木瓜酶各 3.6g,溶于 100mL 2mol/L 乙酸钠溶液。
- 9.11 流动相配制:用 0.05 mol/L 乙酸钠溶液与甲醇按适当比例混合。
- 9.12 标准溶液
- 9.12.1 标准储备溶液,维生素 B<sub>2</sub>的浓度为 500 μg/mL。

精确称取 0.0500g 维生素 B<sub>2</sub>,用 0.01 mol/L 盐酸(9.7)溶解并定容于 100mL 容量瓶中,放入冰箱中保存。

- 9.12.2 标准工作液,维生素 B<sub>2</sub>的浓度为 0.5 μg/mL。

在测定时,将标准储备液用重蒸水再稀释 1000 倍,所得溶液经 0.3μm 滤膜过滤。

## 10 仪器与设备

常用实验室仪器及:

- 10.1 高效液相色谱仪或具同等性能的高效液相色谱仪。
- 10.2 荧光分光仪(带 9μL 流动池)或具波长可调功能的同等性能荧光检测器。
- 10.3 C<sub>18</sub>反相色谱柱(dp 5μm,25cm×4.6mm)或具同等性能的色谱柱。
- 10.4 组织捣碎机(10000~12000r/min)。
- 10.5 高压杀菌锅。

## 11 操作步骤

### 11.1 样品处理

11.1.1 称样:将样品放入捣碎机中捣碎后,精确称取 5.0~10.0 g(内含维生素 B<sub>2</sub>5μg 以上)于三角瓶中。

11.1.2 水解:加适量的盐酸(9.6),控制样液中酸浓度在 0.1 mol/L 左右,将三角瓶内的样液摇匀后,放入高压杀菌锅内,在 121 °C 下保持 30 min,待冷却后取出,轻摇数次。

11.1.3 酶解:冷却至 40 °C 以下,分别加入 2.5 mL 混合酶液(9.10),摇匀后,置于 37 °C 培养箱中过夜。

11.1.4 定容:用 0.1 mol/L 氢氧化钠将样液 pH 值调节至 6.0 左右,再用二次重蒸水定容至 100 mL。

11.1.5 过滤:样液经定量滤纸过滤,接取少量滤液以备进样。

### 11.2 样品测定

#### 11.2.1 色谱条件

流动相:0.05 mol/L 乙酸钠溶液(9.8):甲醇(9.4)(65:35,体积比)。

流 速：1.00mL/min。

检测波长：激发波长 462nm，发射波长 522nm。

## 12 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 B}_2 \text{ 的含量(mg/100g)} = \frac{c \times F \times V \times 100}{m \times 100} \dots\dots\dots (2)$$

式中： $c$ ——进样样液的浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

$F$ ——稀释倍数；

$V$ ——定容容积， $\text{mL}$ ；

$m$ ——样品的质量， $\text{g}$ 。

## 13 允许差

### 13.1 重复性

同一样品两次测定结果之差不得超过平均值的 5%。

### 13.2 重现性

同一样品在两个实验室测定结果之差不得超过平均值的 5%。



## 前 言

维生素 B<sub>12</sub> 的测定有化学法、微生物法、分光光度法、气相色谱法等,本标准给出的反相高压液相色谱法,是在参阅了有关国内外资料的基础上,经反复实验而确定的,具有快速、经济、准确度高的优点。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨金宝、鄂来明、王芸、刘波。





婴幼儿配方食品和乳粉  
维生素 B<sub>6</sub> 的测定

GB/T 5413.13—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin B<sub>6</sub> content

## 1 范围

本标准规定了用反相液相色谱法测定维生素 B<sub>6</sub> 的方法。  
本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中维生素 B<sub>6</sub> 的测定。

## 2 方法提要

样品经热水萃取等前处理后,经 C<sub>18</sub> 色谱柱分离,荧光检测器检测,外标法定量维生素 B<sub>6</sub> (吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺) 的含量。

## 3 试剂

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 高峰氏淀粉酶(Taka-Diastase)。
- 3.2 盐酸溶液, c(HCl) 为 5.0mol/L、0.1mol/L。
- 3.3 氢氧化钠溶液, c(NaOH) 为 5.0mol/L、0.1mol/L。
- 3.4 冰乙酸:优级纯。
- 3.5 无水甲醇:色谱纯。
- 3.6 辛烷磺酸钠:优级纯。
- 3.7 三乙胺:体积分数 ≥ 99.9%。
- 3.8 标准溶液

- 3.8.1 吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准贮备溶液,浓度均为 200μg/mL。

准确称取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准品各 20.00mg,用水溶解并定容至 100mL 容量瓶中。

- 3.8.2 吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准工作溶液,浓度均为 2.0μg/mL。

取 1.0mL 标准贮备溶液(3.8.1),用水定容至 100mL。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

- 4.1 超声波振荡器。
- 4.2 高压液相色谱仪:带荧光检测器。
- 4.3 色谱柱:Varian MCH-10μm 30cm×4mm, C<sub>18</sub> 或具有同等性能的色谱柱。
- 4.4 酸度计。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

## 5 操作步骤

### 5.1 样品预处理

#### 5.1.1 含淀粉的样品

精确称取 5.0g 样品,放入 150mL 锥形瓶中,加入 0.5gTaka 淀粉酶(3.1),再加入 25mL 45~50℃ 的蒸馏水,混合均匀后,用氮气排除瓶内空气,盖上瓶塞,置 45℃ 烘箱内 30min,取出冷却至室温。

#### 5.1.2 不含淀粉的样品

精确称取 5.0g 样品,放入 150mL 锥形瓶中,加入 25mL 60℃ 的蒸馏水,振摇,静置 5~10min,使样品充分溶解并降至室温。

### 5.2 测定液的制备

5.2.1 用盐酸溶液(3.2)慢慢调节样品溶液的 pH 值至 1.70,放置约 1min,再用氢氧化钠溶液(3.3)调节样品溶液的 pH 值至 4.50。

5.2.2 将样品溶液转移到 50mL 容量瓶中,用蒸馏水反复冲洗锥形瓶,洗液合并于 50mL 容量瓶中,并用水定容至 50mL。

5.2.3 把上述容量瓶放入超声波水浴(4.1)中,振荡 10min。

5.2.4 另取 50mL 容量瓶,上面放入三角漏斗和滤纸,把样品溶液倒入其中,自然过滤。滤液再经 0.45μm 微孔滤膜加压过滤,用试管收集,即为样品待测液。

### 5.3 色谱条件

检测灵敏度:0.002AU/MV。

检测器条件:荧光激发波长  $E_x$ :293nm,发射波长  $E_m$ :395nm。

柱温:30℃。

流速:1.00mL/min

流动相:体积分数为 5.0% 的甲醇、0.20g/100mL 辛酸磺酸钠、体积分数为 0.25% 的三乙胺水溶液,用乙酸调 pH=3.00。

### 5.4 定量分析(外标法)

注射一定量的标准工作液(3.8.2)进入色谱仪,得到组分  $i$  的峰高(或峰面积) $A_i$ ;注射等体积的样品待测液进入色谱仪,得到组分  $i$  的峰高(或峰面积) $B_i$ 。

## 6 分析结果表述

$$\text{样品中维生素 B}_6 \text{ 的含量(mg/100g)} = X_{\text{游}} + X_{\text{蔗}} + X_{\text{糖}} \dots\dots\dots (1)$$

注:样品中维生素 B<sub>6</sub> 含量是各组分的含量之和。

$$\text{样品中各组分含量(mg/100g)} = \frac{c_{\text{标}} \times B_i \times V \times 100}{m \times A_i \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:  $B_i$  —— 样品组分  $i$  的峰高或面积;

$A_i$  —— 标准工作液中组分  $i$  的峰高或面积;

$c_{\text{标}}$  —— 标准工作液中组分  $i$  的质量浓度, μg/mL;

$m$  —— 样品的质量, g;

$V$  —— 样品溶液体积, mL。

7 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%。



## 前 言

本标准等效采用美国公职分析化学师协会(AOAC)方法,方法准确、灵敏度高。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:张玉杰、王芸、殷晓红、吕为群。



婴幼儿配方食品和乳粉  
维生素B<sub>12</sub>的测定

GB/T 5413.14—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin B<sub>12</sub> content

## 1 范围

本标准规定了用微生物法测定维生素B<sub>12</sub>的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中维生素B<sub>12</sub>的测定。

## 2 方法原理

莱士曼氏乳酸杆菌(*Lactobacillus leichmannii*)对维生素B<sub>12</sub>的存在具有极高灵敏度。利用这种特异性可定量测出样品中维生素B<sub>12</sub>的含量。

## 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 生理盐水:9g/L。

3.2 乙醇:体积分数为25%。

3.3 无水磷酸氢二钠。

3.4 无水偏重亚硫酸钠。

3.5 柠檬酸(含一个结晶水)。

3.6 菌种:莱士曼氏乳酸杆菌(*Lactobacillus leichmannii*)。

3.7 培养基。

3.7.1 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,蒸馏水 1000mL,pH6.8±0.2(25℃)。

3.7.2 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,蒸馏水 1000mL,pH6.8±0.2(25℃)。

3.7.3 维生素B<sub>12</sub>测定用培养基:无维生素酸水解酪蛋白 15g,葡萄糖 40g,天门冬酰胺 0.2g,柠檬酸钠 20g,抗坏血酸 4g,L-胱氨酸 0.4g,DL-色氨酸 0.4g,硫酸腺嘌呤 20mg,盐酸鸟嘌呤 20mg,尿嘧啶 20mg,黄嘌呤 20mg,核黄素 1mg,盐酸硫胺素 1mg,生物素 10μg,烟酸 2mg,p-氨基苯甲酸 2mg,泛酸钙 1mg,盐酸吡哆醇 4mg,盐酸吡哆醛 4mg,盐酸吡哆胺 800μg,叶酸 200μg,磷酸二氢钾 1g,磷酸氢二钾 1g,硫酸镁 0.4mg,氯化钠 20mg,硫酸亚铁 20mg,硫酸锰 20mg,聚山梨糖单油酸酯 2g,蒸馏水 1000mL,pH6.0±0.2(25℃)。

3.8 维生素B<sub>12</sub>:标准品。

## 4 仪器

常用实验室仪器及：  
分光光度计。

## 5 制备

### 5.1 菌种的制备

5.1.1 将保存在直柱状乳酸杆菌琼脂培养基中的莱士曼氏乳酸杆菌接种到新的培养基中。培养后再转接一次，然后再将其从固体培养基上转接到乳酸杆菌肉汤培养基中培养。

5.1.2 将乳酸杆菌肉汤中的培养液以 2000r/min 离心 2~3min，倾出上清液，加入 10mL 生理盐水(3.1)，搅匀，再离心 2~3min，如此清洗 3~4 次，吸 0.4mL 该菌悬液于 10mL 盐水(3.1)中，待测。

5.1.3 用分光光度计，以生理盐水(3.1)做空白，于 550nm 波长下测 5.1.2 中菌悬液的透光率，此时应在 60%~80% 之间。

### 5.2 标准溶液的制备

5.2.1 维生素 B<sub>12</sub> 标准贮备液，浓度为 100ng/mL。

精确称取维生素 B<sub>12</sub> 标准品，用乙醇(3.2)定容到维生素 B<sub>12</sub> 浓度为 100ng/mL。

5.2.2 维生素 B<sub>12</sub> 中间贮备液，浓度为 1ng/mL。

用乙醇(3.2)将 10mL 标准贮备液(5.2.1)定容至 1000mL。

5.2.3 标准工作液，分二个浓度：高浓度——维生素 B<sub>12</sub> 的浓度为 0.02ng/mL；低浓度——维生素 B<sub>12</sub> 的浓度为 0.01ng/mL。从中间液中(5.2.2)吸二个 5mL，用蒸馏水分别定容到 250mL 和 500mL。

## 6 操作步骤

### 6.1 样品的处理

6.1.1 无水磷酸氢二钠(3.3)1.3g，无水偏重亚硫酸钠(3.4)1.0g，柠檬酸(含一个结晶水)(3.5)1.2g，用 100mL 蒸馏水溶解。

6.1.2 称一定量的样品(约含维生素 B<sub>12</sub> 50~100ng)，用 10mL 的上述溶液(6.1.1)混合后，再加 150mL 蒸馏水，于 121℃ 水解 10min，冷却后调 pH 至 4.5，再用蒸馏水稀释，使最终溶液中维生素 B<sub>12</sub> 的质量浓度约在 0.01~0.02ng/mL，偏重亚硫酸钠的质量浓度小于 0.03mg/mL。

### 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 B<sub>12</sub> 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 <sup>1)</sup> , 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

按表 2 顺序加蒸馏水、样品溶液和维生素 B<sub>12</sub> 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 接种

将 6.2 和 6.3 中所有的试管于 121℃ 灭菌 5min, 然后迅速冷却。将 6.1.2 中的菌悬液用毛细滴管向上述试管中各加 1 滴(其中标准曲线管中 No. 1 除外), 混匀, 37℃ ± 0.5℃ 培养 19~20h。

#### 6.5 测定

以接种空白管做对照, 测最高浓度标准样管的  $T$ , 二个小时后重新读数, 二次结果  $T$  值 ≤ 2%, 则取出全部检验管测其  $T$ , 并记录。

#### 7 分析结果的表述

以标样含维生素 B<sub>12</sub> 的量为横坐标,  $T$  值为纵坐标做工作曲线。根据样品测得的  $T$  值, 从标准曲线中查得维生素 B<sub>12</sub> 含量的平均值, 再根据式(1)计算每百克(或毫升)样品中的实际含量:

$$\text{样品中维生素 B}_{12}[\mu\text{g}/100\text{g}(\text{mL})] = \frac{x}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $x$  —— 从曲线中查得样品中维生素 B<sub>12</sub> 的平均含量, ng;

$F$  —— 稀释因子;

$m$  —— 样品的质量(或体积), g(或 mL)。

#### 8 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 10%。

## 前 言

本标准给出两种方法,方法一是微生物法,为等同采用美国公职分析化学师协会(AOAC)方法,虽然操作步骤繁杂,但测定结果准确度高。方法二是高压液相色谱法,是经实验确定的一种快速、准确的方法。

本标准方法一为仲裁法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨金宝、鄂来明、王芸、刘波。





婴幼儿配方食品和乳粉  
烟酸和烟酰胺的测定

GB/T 5413.15—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin PP content

1 范围

本标准规定了用微生物法和反相高压液相色谱法测定烟酸和烟酰胺的方法。

本标准方法一适用于婴幼儿配方食品和乳粉中烟酸和烟酰胺的测定；方法二适用于婴儿配方乳粉中烟酸和烟酰胺的测定。

方法一 微生物法

2 方法提要

通过对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)生长的酸度测定来评价烟酸和烟酰胺的含量。

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 硫酸溶液, $c(\text{H}_2\text{SO}_4)$ 为 10mol/L。

将质量分数为 95%~98%的 280mL 浓硫酸缓慢加入到 600mL 水中,边加边搅拌,冷却,定容到 1000mL。

3.2 硫酸溶液, $c(\text{H}_2\text{SO}_4)$ 为 1mol/L。

将 100mL 10mol/L 的硫酸溶液(3.1)用水稀释至 1000mL。

3.3 氢氧化钠溶液, $c(\text{NaOH})$ 为 150g/L。

将 150g 氢氧化钠溶解在盛有 400mL 水的烧杯中,该烧杯放入冷水浴中,冷却后,再用水稀释至 1000mL,搅拌,转移到试剂瓶中。

3.4 盐酸溶液, $c(\text{HCl})$ 为 0.1mol/L。

吸取 10mol/L 的盐酸溶液 10mL,用水稀释至 1000mL。

3.5 氢氧化钠溶液, $c(\text{NaOH})$ 为 0.1mol/L。

用水稀释 1mol/L 的氢氧化钠溶液 100mL 至 1L,用邻苯二甲酸氢钾标定。

3.6 乙醇溶液,体积分数为 25%。

将体积分数为 95%的乙醇溶液 250mL,用水稀释至 950mL。

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

3.8 培养基

3.8.1 乳酸杆菌琼脂培养基:光解脲 15g,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℃)。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

3.8.2 乳酸杆菌肉汤培养基:光解脲 15g,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℃)。

3.8.3 烟酸测定用培养基:维生素测定用 Casamino Acids 12g,葡萄糖 40g,乙酸钠 20g,L-胱氨酸 0.4g,DL-色氨酸 0.2g,盐酸腺嘌呤 20mg,盐酸鸟嘌呤 20mg,尿嘧啶 20mg,盐酸硫胺素 200μg,泛酸钙 200μg,盐酸吡哆醇 400μg,核黄素 400μg,β-氨基苯甲酸 100μg,生物素 0.8μg,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±0.2(25℃)。

#### 4 仪器

常用实验室仪器及:

pH 计。

#### 5 制备

##### 5.1 接种的制备

从植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)贮备菌种中移取部分菌体到灭菌的 10mL 液体培养基中。选择 30℃(±0.5℃)~35℃(±0.5℃)之间恒温培养 18~24h。

##### 5.2 标准溶液的制备

###### 5.2.1 烟酸标准贮备液,浓度为 100μg/mL。

从五氧化二磷干燥器中取出标样,精确称取 50~60mg 尼克酸,溶解在乙醇溶液(3.6)中,继续加乙醇溶液,使尼克酸的准确含量为 100μg/mL,放入冰箱。

###### 5.2.2 烟酸标准中间溶液,浓度为 10μg/mL。

从标准贮备液(5.2.1)中吸 100mL,加体积分数为 25%乙醇溶液至 1L,贮于冰箱中。

###### 5.2.3 标准工作溶液,烟酸的浓度 100ng/mL。

从标准中间液(5.2.2)中吸 5.0mL,用水稀释至 500.0mL。每次使用前重新制备该标准溶液。

#### 6 操作步骤

##### 6.1 测定溶液的制备

精确称取一定量样品,约含烟酸 0.1mg。转入 250mL 烧杯中,加 10 倍于干粉质量的 2mol/L 的硫酸溶液。

充分混合样品,用 1mol/L 的硫酸溶液(3.2)洗下瓶口边上的样品,121℃灭菌 30min,冷却。要充分搅拌,直到颗粒分散。

充分搅拌,用氢氧化钠溶液(3.3)调 pH 值 6.0~6.5,迅速加入盐酸溶液(3.4),直到不再有蛋白产生(pH4.5 是许多蛋白质的等电点),用水稀释混合物到 100mL,过滤。如果很难过滤,离心或通过过滤板过滤。吸 25mL 上清液到 100mL 烧瓶中,充分搅拌,调 pH6.8(用 3.5),移入到 250mL 带有刻度的容量瓶中,用水稀释到刻度,如产生絮状,再过滤。

##### 6.2 标准曲线的制备

按表 1 顺序加入蒸馏水,标准溶液和培养基于试管中,一式三份。

表 1

试管号 No.	1	2	3	4	5	6	7
蒸馏水, mL	5.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0.0
标准溶液, mL	0.0	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
培养基, mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

##### 6.3 样品

按表 2 顺序加入蒸馏水、样品和培养基于试管中，一式三份。

表 2

试管号 No.	1	2	3	4
蒸馏水, mL	4.0	3.0	2.0	1.0
样品, mL	1.0	2.0	3.0	4.0
培养基, mL	5.0	5.0	5.0	5.0

#### 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℃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。除标准曲线中试管 No. 1 以外。盖上盖，充分振荡所有管。

#### 6.6 培养

在 28~40℃之间选择一个恒定温度(±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的预测，未接种管是清的，标准溶液和样品溶液中无其他菌生长。

用溴麝香草酚蓝作指示剂，用氢氧化钠溶液(3.5)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 c(NaOH)=0.1mol/L 的氢氧化钠溶液 8~12mL 的滴定度。

#### 7 分析结果的表述

$$\text{样品中烟酸含量(mg/100g 或 100mL)} = \frac{X}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \quad \dots\dots (1)$$

式中：X——从曲线中查得的样品中烟酸的平均含量，μg；

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%。

#### 方法二 反相高压液相色谱法

#### 9 方法提要

样品经热水萃取、酸性沉淀蛋白质后，以反相 C<sub>18</sub> 色谱柱分离，用紫外检测器定量。

#### 10 试剂

10.1 盐酸溶液：c(HCl)为 5.0mol/L。

10.2 氢氧化钠溶液：c(NaOH)为 5.0mol/L。

10.3 高氯酸：体积分数为 60%。

10.4 无水甲醇：色谱纯。

10.5 异丙醇：色谱纯。

10.6 辛烷磺酸钠:优级纯。

10.7 标准溶液

10.7.1 烟酸及烟酰胺标准中间溶液,浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

称取烟酸及烟酰胺标准品各 10.0mg,用水溶解,然后分别定容至 100mL 容量瓶中。

10.7.2 烟酸及烟酰胺混合标准工作溶液,浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

各取 5.0mL 上述标准中间溶液于 100mL 容量瓶中,用水定容(烟酸、烟酰胺浓度均为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

## 11 仪器

常用实验室仪器及:

11.1 高效液相色谱仪:带紫外检测器。

11.2 色谱柱:15cm $\times$ 4.6mm,或同等性能的反相 C<sub>18</sub>柱。

11.3 酸度计。

11.4 超声波振荡器。

## 12 操作步骤

### 12.1 样品预处理

12.1.1 称样:精确称取样品 5.000g,放入 100mL 锥形瓶中。

12.1.2 提取:在上述锥形瓶中,加入约 60 $^{\circ}\text{C}$  的蒸馏水 25mL,摇匀后,置于超声波振荡器中振摇 10min。

12.1.3 沉淀:待样品溶液降至室温后,用盐酸溶液(10.1)调节样品溶液的 pH 值至 1.70,放置 2min 后,再用氢氧化钠溶液(10.2)调节样品溶液的 pH 值至 4.50。

12.1.4 定容:将样品溶液转至 50mL 容量瓶中,用蒸馏水反复冲洗锥形瓶,洗液合并于 50mL 容量瓶中,用水定容至刻度后,倒入漏斗中自然过滤。取此滤液约 10mL,经 0.45 $\mu\text{m}$  微孔滤膜加压过滤,用 10mL 试管收集此滤液,即样品备用液。

### 12.2 仪器工作条件

检测器灵敏度:0.002AU/mV。

检测器波长:261nm。

柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。

流速:1.00mL/min。

流动相:体积分数为 7.0% 的甲醇、体积分数为 2.0% 的异丙醇、1g/L 辛烷磺酸钠的水溶液,用高氯酸调 pH=2.10。

### 12.3 定量分析

12.3.1 上机样液的配制:准确吸取样品备用液 1.00mL 及 1.00mL 蒸馏水,合并于试管 A 中,此为 A 液;另准确吸取 1.00mL 样品备用液及 1.00mL 标准工作液,合并于试管 B 中,此为 B 液。

12.3.2 上机测定:注射一定量的 A 液进入液相色谱仪,得到峰面积 A<sub>i</sub>;注射与 A 液相同体积的 B 液进入色谱仪,得到峰面积 B<sub>i</sub>。

## 13 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 PP 的含量(mg/100g)} = X_1 + X_2 \dots\dots\dots (2)$$

式中: X<sub>1</sub>——样品中烟酸的含量,mg/100g;

X<sub>2</sub>——样品中烟酰胺的含量,mg/100g。

其中 X<sub>1</sub>或 X<sub>2</sub>:

$$X_{1或2}(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{A_i \times c_s \times V \times 100}{m(B_i - A_i) \times 1000} \dots\dots\dots(3)$$

式中： $m$ ——样品的质量， $\text{g}$ ；

$A_i$ ——由 12.3.2 所得的 A 液的峰面积；

$B_i$ ——由 12.3.2 所得的 B 液的峰面积；

$c_s$ ——标准工作液中烟酸或烟酰胺的浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

$V$ ——样品溶液的体积， $\text{mL}$ 。

#### 14 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 10%。



## 前 言

本标准等效采用美国公职分析化学师协会(AOAC)方法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:殷晓红、王芸、杨金宝、张玉杰。



婴幼儿配方食品和乳粉  
叶酸(叶酸盐活性)的测定

GB/T 5413.16—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of folic acid (folate activity)

1 范围

本标准规定了用微生物法测定叶酸(叶酸盐活性)的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中叶酸(叶酸盐活性)的测定。

2 方法原理

叶酸盐的活性通过干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)的生长情况来评价。

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 鸡胰腺:称取 100mg 干燥的鸡胰腺,加 20mL 蒸馏水,搅拌 15min,离心 10min(3000r/min),取上清液用。现用现配。

3.2 生理盐水:称 0.9g 氯化钠(分析纯)于 100mL 容量瓶中,稀释至刻度,振荡溶解。分装 10mL 到每个培养管中,盖上盖,121℃灭菌 20min,每周准备一次。

3.3 磷酸缓冲液: $c(\text{H}_3\text{PO}_4)$ 为 0.05mol/L,含有抗坏血酸。溶解 50mg 抗坏血酸于 100mL 0.05mol/L 磷酸缓冲液中,现用现配。

3.4 叶酸,标准品。

3.5 浓氨水。

3.6 甲苯。

3.7 菌种:干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。

3.8 培养基。

3.8.1 乳酸杆菌琼脂培养基:胨化乳 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℃)。

3.8.2 乳酸杆菌肉汤培养基:胨化乳 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 100mL, pH6.8±0.2(25℃)。

3.8.3 叶酸测定用培养基:酪蛋白胨 10g,葡萄糖 40g,乙酸钠 40g,磷酸氢二钾 1g,磷酸二氢钾 1g,DL-色氨酸 0.2g,L-天门冬氨酸 0.6g,L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g,硫酸腺嘌呤 10mg,盐酸鸟嘌呤 10mg,尿嘧啶 10mg,黄嘌呤 20mg,聚山梨糖 0.1g,谷光甘肽 5mg,硫酸镁 0.4g,氯化钠 20mg,硫酸亚铁 20mg,硫酸锰 15mg,核黄素 1mg,p-氨基苯甲酸 2mg,维生素 B<sub>6</sub> 4mg,盐酸硫胺素 400μg,泛酸钙 800μg,烟酸 800μg,生物素 20μg,加蒸馏水至 1000mL, pH6.7±0.1(25℃)。

3.9 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH})$ 为 0.1mol/L。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施



## 4 仪器

常用实验室仪器及：

- 4.1 培养箱。
- 4.2 灭菌釜。
- 4.3 培养管和帽。
- 4.4 试管振荡架。
- 4.5 接种针和接种环。
- 4.6 pH 计。
- 4.7 离心机。

## 5 制备

### 5.1 菌种的制备

5.1.1 将纯菌种植物乳杆菌(*Lactobacillus casei*)从菌种培养基上接种到三个转接培养基试管中,37℃培养 24h,每月接种一次,标好,贮于冰箱中。再以每月接种的培养管(4.3)的一支中再接种 1 支转接培养基,37℃培养 24h,每周做一次这样的转接,每周从接种管中接种 4~5 支转接培养基接种管,37℃培养 24h,标好,作为每日测定用。

每月月初从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌种。

5.1.2 从日接种管中接种一管于菌种培养基中,37℃培养 24h。在无菌条件下离心该培养液 10min(2000r/min),倾去上清液,再用 10mL 生理盐水(3.2)将细菌细胞清洗,再离心 10min(2000r/min),倾去上清液,再用另外的 10mL 生理盐水(3.2)清洗。如前面一样离心,弃去上清液,再加 10mL 生理盐水(3.2)。吸 1mL 该菌悬液于 10mL 生理盐水(3.2)中,混合均匀。

### 5.2 标准溶液的制备

5.2.1 标准贮备液,叶酸的浓度 500μg/mL。

精确称取 55~56mg 叶酸标准品(3.4),用 50mL 蒸馏水定量地转入 100mL 容量瓶中,加 2mL 氨水(3.5)。溶液制备后,计算溶液的体积,要求贮备液中叶酸盐的浓度为 500μg/mL:

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

或简化为:

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

式中:  $m$ ——标样的质量,mg;

$c$ ——标样的纯度,g/100g。

用蒸馏水稀释溶液至刻度,用吸管加蒸馏水到所要求的计算得到的体积,充分混合,放入红色或棕色瓶子中,贮于冰箱。保存期为 4 个月。

5.2.2 标准中间液,叶酸的浓度 50μg/mL。

精确吸取 10mL 标准贮备液(5.2.1)液于 100mL 棕色或红色容量瓶中,用蒸馏水稀至刻度,充分混合,贮于冰箱中,保存期 1 个月。

5.2.3 标准工作液,叶酸的浓度 0.1ng/mL。

吸取 1mL 标准中间液(5.2.2)于 100mL 棕色容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,混合。再吸该液 1mL 于 100mL 棕色容量瓶中,定容,混合。

再从上液中吸 5mL 于 250mL 棕色容量瓶中,用 0.05mol/L 磷酸缓冲液定容到刻度,混合,即为标准工作液(0.0001μg/mL 或 0.1ng/mL)。每次测定前制备。



## 6 操作步骤

### 6.1 测定溶液的制备

#### 6.1.1 粉状样品

精确称取一定量的样品(样品中约含有 5 $\mu\text{g}$  叶酸)于 100mL 烧杯中,用 25~30mL 水复原样品,定量地转入 100mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度。接 6.1.3 步骤继续。

#### 6.1.2 液体样品

吸取定量的样品,大约含 5 $\mu\text{g}$  的叶酸于 100mL 容量瓶中,用水定容至刻度,接 6.1.3。

#### 6.1.3 溶液中叶酸的质量浓度大约为 0.05 $\mu\text{g}$ (50ng)/mL。

吸 1mL 稀释样品和 1mL 鸡胰腺(3.1)于一个 18mm $\times$ 150mm 的带螺旋盖的培养试管中,充分混合。加 18mL 0.05mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液(3.3),再加 1mL 甲苯(3.5)。作一个空白对照管,吸 1mL 蒸馏水和 1mL 鸡胰腺于空白管中,也加 0.05mol/L 缓冲液(3.3)18mL 及 1mL 甲苯(3.5)。

于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养样品管和空白管 16h,再于 121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 10min,之后离心,用 0.05mol/L 磷酸缓冲液稀释,得到叶酸盐的质量浓度约为 0.1ng/mL 的溶液。

### 6.2 标准曲线的制备

按表 1 顺序加入蒸馏水,标准溶液和叶酸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 <sup>1)</sup> , 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

按表 2 顺序加蒸馏水、样品溶液和叶酸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 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 10min。

### 6.5 接种

无菌的接种每个管,均加入一滴适当的接种物。除标准管 No. 7 以外。盖上盖,充分振荡混合所有管。

### 6.6 培养

在 28~40 $^{\circ}\text{C}$  之间选择一个恒定温度( $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ),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的预测,未接种管是清的,标准和样品中无其他菌生长。

#### 6.7.1 滴定

用溴麝香草酚蓝作指示剂,用 0.1mol/L 氢氧化钠(3.9)滴定每个管中溶液,或以 pH6.8 作为电位滴定终点。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

在培养之后读出管内容物的 pH 值,近似至 0.01pH 值单位。

### 6.8 计算

对于每个标准溶液作出一个浓度反应曲线(酸度,pH 值,透射率或吸收值),每个管中分别含有相对应的参考标准含量。

对每个水平的检验溶液进行维生素的定量测定,废弃任何低于 0.5mL 标准溶液的吸收值或高于 4.5mL 标准溶液的吸收值。

对每个水平的检验溶液,计算其每毫升中的维生素含量。计算所得值的平均数,每个管的测得值不得超过该平均值的±15%。如果所得到的管数少于所测定的四种水平的稀释液的管数的 2/3,用于计算样品浓度的数据就是不充分的。如果剩余管数是原来管数的 2/3 或更多,则可根据平均值计算其样品中的含量。

## 7 分析结果的表述

$$\text{样品中叶酸含量(mg/100g 或 100mL)} = [(X \times D) - EB] \times \frac{100}{1000m} \quad \dots\dots(2)$$

式中:  $X$ ——不同水平检验溶液其每毫升中的叶酸含量值,ng;

$D$ ——1mL 样品在经过酶处理后的稀释度;

$EB$ ——酶处理液空白管中叶酸含量值,ng/mL;

$m$ ——最初称(吸)取样品的质量,g(或 mL)。

## 8 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 10%。

## 前 言

本标准给出两种方法,方法一是微生物法,为等效采用美国公职分析化学师协会(AOAC)的方法,虽然操作步骤繁杂,但测定结果准确度高。方法二是高压液相色谱法,是经实验确定的一种快速、准确的方法。

本标准方法一为仲裁法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:张玉杰、王芸、殷晓红、杨金宝、吕为群。

美析

MACY

MACY INST

光度计系列生产

www.macylab.com TEL:400-6

婴幼儿配方食品和乳粉  
泛酸的测定Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of pantothenic acid

## 1 范围

本标准规定了用微生物法和高压液相色谱法测定泛酸的方法。

本标准方法一适用于婴幼儿配方食品和乳粉中泛酸的测定,方法二适用于乳粉中泛酸的测定。

## 方法一 微生物法

## 2 方法原理

利用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的繁殖量与样品中的泛酸含量成正比的关系可计算出样品中的泛酸含量。

## 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 生理盐水:9g 氯化钠溶于1000mL 容量瓶中。

3.2 泛酸钙:标准品。

3.3 乙酸:c(HAc)为0.2mol/L。吸12mL 冰乙酸用蒸馏水稀释至1L。

3.4 甲苯。

3.5 乙酸钠:c(NaAc)为0.2mol/L。溶解16.4g 无水乙酸钠于水中,稀释至1000mL。

3.6 菌种——植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

3.7 培养基

3.7.1 乳酸杆菌琼脂培养基:光解陈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℃)。

3.7.2 乳酸杆菌肉汤培养基:光解陈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℃)。

3.7.3 泛酸测定用培养基:葡萄糖40g,乙酸钠20g,无维生素酸水解酪蛋白10g,磷酸氢二钾1g,磷酸二氢钾1g,L-胱氨酸0.4g,L-色氨酸0.1g,硫酸镁0.4g,氯化钠20mg,硫酸亚铁20mg,硫酸锰20mg,硫酸腺嘌呤20mg,盐酸鸟嘌呤20mg,尿嘧啶20mg,胡萝卜素400μg,盐酸硫胺素200μg,生物素0.8μg,p-氨基苯甲酸200μg,烟酸1mg,盐酸吡哆醇800μg,聚山梨糖单油酸酯0.1g,加蒸馏水至1000mL,pH6.7±0.1(25℃)。

## 4 仪器

常用实验室仪器及分光光度计。

## 5 制备

## 5.1 菌种的制备

5.1.1 将保存在直柱状固体培养基中的植物乳杆菌接种到新的乳酸杆菌琼脂培养基中,培养后再继代培养一次,然后将其转接到乳酸杆菌肉汤培养基中培养后备用。

5.1.2 将 5.1.1 中的菌悬液以 2000r/min 离心 2~3min,倾出上清液,加入 10mL 生理盐水(3.1),搅匀,再离心 2~3min,如此清洗 3 次,吸 1.0mL 该菌悬液于 10mL 生理盐水(3.1)中。

5.1.3 用 721 型分光光度计,于 550nm 波长下,以生理盐水(3.1)做对照,测 5.1.2 菌悬液的浊度值,此值应在 60%~80%之间。

## 5.2 标准溶液的制备

5.2.1 泛酸标准储备液,浓度 40 $\mu$ g/mL。

精确称取 45~55mg 泛酸钙标准品(3.2),溶于 500mL 蒸馏水中,加 10mL 乙酸(3.3),加 100mL 乙酸钠(3.5),用水稀释至泛酸钙精确浓度为 43.47 $\mu$ g/mL(即泛酸浓度为 40 $\mu$ g/mL),加甲苯(3.4)贮于冰箱中。

5.2.2 泛酸中间储备液,浓度 1 $\mu$ g/mL。

取 25mL 标准储备液(5.2.1),加入大约 500mL 蒸馏水,乙酸 10mL(3.3),乙酸钠 100mL(3.5),再用水稀释至 1L。加甲苯(3.4)贮于冰箱中。

5.2.3 泛酸标准工作液,高浓度的为 10ng/mL,低浓度的为 5ng/mL。

吸 5.0mL 中间储备液(5.2.2),用蒸馏水稀至 500.0mL。每次测定前制备。

吸 5.0mL 中间储备液(5.2.2),用蒸馏水稀至 1000mL。每次测定前制备。

## 6 测定

## 6.1 样品的处理

称取一定量的样品,加入 10mL 缓冲液(称 24.2g Trizma Base 溶于 200mL 水中即可),再加足量的水,121 $^{\circ}$ C 水解 15min,冷却,调 pH 至 4.5,然后定容到 250mL,过滤,吸 4mL 滤液,稀释至泛酸的浓度约为 5ng/mL,待用。

## 6.2 标准曲线的制备

按表 1 顺序加蒸馏水、标准溶液和泛酸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 <sup>1)</sup> , 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 中加低浓度标准工作液, No. 8~10 中加高浓度标准工作液。										

## 6.3 测定液样品

按表 2 顺序加蒸馏水、样品溶液和泛酸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
样品溶液, mL	1	2	3	4
培养基, mL	5	5	5	5

#### 6.4 接种

将 6.2 和 6.3 中所有的试管于 121℃ 杀菌 5min, 然后迅速冷却。将 5.1.2 中的菌悬液用毛细滴管向上述试管内各加一滴(其中标准溶液中试管 No1 除外), 混匀, 37℃ ± 0.5℃ 培养 19~20h。

#### 6.5 测定

以接种空白管做对照, 测最高浓度标准样管的透光率, 2h 后重新读数, 二次结果透光率 ≤ 2%, 则取出全部检验管测其透光率, 并记录。

#### 7 计算

以标准泛酸含量作横坐标, 透光率为纵坐标作工作曲线。根据样品测得的透光率, 从标准曲线中查得泛酸含量的平均值, 再根据式(1)计算:

$$\text{样品中泛酸含量(mg/100g 或 mg/100mL)} = \frac{z}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $z$  —— 从曲线中查得样品中泛酸的平均含量,  $\mu\text{g}$ ;

$F$  —— 稀释因子;

$m$  —— 样品的质量(或体积),  $\text{g}$ (或  $\text{mL}$ )。

#### 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%。

#### 方法二 高压液相色谱法

#### 9 方法提要

样品经水提取, 过滤, 除去蛋白质后, 用高压液相色谱测定滤液中泛酸羧基的紫外吸收。

#### 10 试剂

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。

10.1 硅酮树脂; 食品添加剂。

10.2 盐酸;  $c(\text{HCl})$  为 0.1mol/L。

10.3 硫酸锌;  $c(\text{ZnSO}_4)$  为 15g/L。

10.4 乙腈; 光谱纯。

10.5 磷酸二氧钾;  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)$  为 0.02mol/L。称取 2.72g 磷酸二氧钾, 加水溶解成 1000mL。

10.6 乙腈-0.02mol/L 磷酸二氧钾溶液; 体积比 1:9。向 1 体积乙腈中加入 9 体积的 0.02mol/L 磷酸二氧钾, 用盐酸调节 pH 为 3。

#### 11 仪器

常用实验室仪器及:

11.1 离心机。

- 11.2 滤膜过滤器;滤膜1.0 $\mu$ m。  
 11.3 五氧化二磷干燥器。  
 11.4 高压液相色谱仪;带紫外检测器。

## 12 操作步骤

### 12.1 样品溶液的制备

- 12.1.1 准确称取样品约10g,加60mL水和1滴硅树脂(10.1)后,转入离心管中,用盐酸溶液(10.2)调节pH为4~5,加入10mL硫酸锌溶液(10.3)充分混合,离心分离。  
 12.1.2 上清液用滤纸过滤,用100mL容量瓶收集滤液,离心管中残留用少量水冲洗于同一滤纸上,用少量水洗滤纸,洗液与滤液合并,加水至100mL。经滤膜过滤器(11.2)过滤后作为样品溶液。

### 12.2 标准溶液的制备

- 12.2.1 泛酸标准储备液;浓度为1mg/mL。

准确称取在干燥器(11.3)中干燥的泛酸钙1.0918g,加水溶解成1000mL。

- 12.2.2 泛酸标准工作液

准确吸取标准储备液(12.2.1)1,2,4,8,12mL,分别加水成100mL,作为标准工作液,泛酸浓度分别为10,20,40,80,120 $\mu$ g/mL。

### 12.3 测定条件

填充剂;化学结合型硬脂硅烷。

色谱柱;内径6.2mm,长25cm。

洗脱液;乙醇-0.02mol/L磷酸二氧钾(1:9)。

流速;1mL/min。

测定波长;200nm。

注

- 柱的内径和长度可自由选择。
- 洗脱液组成和流速可根据色谱柱情况而改变,没有统一规定。泛酸的保留时间可设定为8~12min。
- 泛酸的最大吸收在波长194nm附近,但是移动相在此处也有吸收,所以测定波长定为200nm。

### 12.4 标准曲线

分别吸取10 $\mu$ L标准工作液(12.2.2),注入高压液相色谱中,根据峰高绘制标准曲线。

注:进样量、灵敏度与高压液相色谱的注入方式有关,因此进样量可在3~20 $\mu$ L之间变动。

### 12.5 样品测定

准确吸取样品溶液(12.1)10 $\mu$ L,注入高压液相色谱仪中,将所得峰高从标准曲线中求出样品溶液中泛酸的浓度。

## 13 分析结果的表述

$$\text{样品中泛酸含量(mg/100g)} = \frac{100 \times c}{m} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中,c——样品溶液中泛酸的质量浓度, $\mu$ g/100g;

m——称取样品的质量,g。

泛酸钙含量(mg/kg)=泛酸含量(mg/100g) $\times$ 1.087

泛酸钠含量(mg/kg)=泛酸含量(mg/100g) $\times$ 1.100

## 14 允许差

同一样品的两次测定值之差不应超过两次测定平均值的10%。

## 前 言

婴幼儿配方食品和乳粉中的维生素 C 以还原型和氧化型两种形式存在,且都具有生物效价。通常采用的滴定法和高压液相色谱法只能测定还原型维生素 C。本标准给出的荧光分光光度法测定的则是维生素 C 的总含量。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨金宝、王芸、郎昭斌。





婴幼儿配方食品和乳粉  
维生素 C 的测定

GB/T 5413.18—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of vitamin C content

## 1 范围

本标准规定了用荧光法测定维生素 C 的方法。

本标准适用于各种婴幼儿配方食品和乳粉中维生素 C 的测定。

## 2 方法提要

抗坏血酸(维生素 C)在活性炭存在下可氧化成脱氢抗坏血酸,它与邻苯二胺反应生成一荧光团,该荧光团在约 350nm 处有最大激发波长,而在约 430nm 处荧光最强,荧光强度与浓度成正比。

加入邻苯二胺以前,使抗坏血酸形成  $\text{HBO}_3$ -脱氢抗坏血酸络合物,可阻止其形成荧光产物,任何残留的荧光均由外来物引起,可将它们作为“空白”。

比较经相同氧化处理的样品和标样的荧光强度可计算出抗坏血酸的含量。

## 3 试剂

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 高峰氏淀粉酶(Taka-Disatase)。

3.2 偏磷酸-乙酸溶液:称取 15g 偏磷酸及 40mL 乙酸于 200mL 水中,溶解后稀释至 500mL 备用。

3.3 酸性活性炭:称取 200g 活性炭(化学纯),加入 1L 体积比为 1:9 的盐酸,加热至沸腾,真空过滤,取下结块于一个大烧杯中,加入 1L 水,搅拌过滤后,再用水清洗一次,在 110~120℃ 烘箱中干燥过夜后使用。

3.4 乙酸钠溶液:用水溶解 500g 三水乙酸钠,并稀释至 1L。

3.5 硼酸-乙酸钠:称取 3g 硼酸,用乙酸钠溶液(3.4)溶解并稀释至 100mL,使用前现配。

3.6 邻苯二胺溶液:质量浓度 200mg/L。称取 20mg 邻苯二胺,用水稀释至 100mL,现用现配。

3.7 维生素 C 标准溶液:浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。称取 0.0500g 抗坏血酸,用偏磷酸-乙酸溶液(3.2)溶解并稀释至 50mL,取 10mL 该溶液用偏磷酸-乙酸溶液(3.2)稀释至 100mL,制成标准溶液。现用现配。

## 4 仪器

常用实验室仪器及荧光分光光度计。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

#### 5.1.1 含淀粉的样品

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

准确称取 5g 样品于 150mL 三角瓶中,加入 0.5g 高峰氏淀粉酶(3.1),再加入 15mL 45~50℃ 的蒸馏水,混合均匀后,用氮气排除瓶中空气,盖上瓶塞,至 45℃ 烘箱内 30min,取出冷却至室温,用偏磷酸-乙酸溶液(3.2)转至 100mL 容量瓶内,定容。

#### 5.1.2 不含淀粉的样品

准确称取 5g 样品,用偏磷酸-乙酸溶液(3.2)溶解,定容至 100mL。

#### 5.2 测定

5.2.1 将上述样液转至放有约 2g 酸性活性炭(3.3)的 250mL 三角瓶中,剧烈摇动,过滤,弃去头几毫升滤液,然后分别吸取 5mL 样品及标准溶液的滤液分置于 25mL 及 100mL 放有 5mL 硼酸-乙酸钠溶液(3.5)的容量瓶中,静止 15min 后,用蒸馏水定容。以此作为标准溶液及样品的空白溶液。

5.2.2 在此 15min 内,吸取另 5mL 样品及标样于其他两个 25mL 及 100mL 放有 5mL 乙酸钠溶液(3.4)和约 15mL 水的容量瓶中,用水稀释至刻度。

5.2.3 分别吸取 2mL 的样品、标样及样品和标样的空白溶液于 4 支试管中。

5.2.4 向每支试管中加入 5mL 邻苯二胺(3.6),摇匀,在避光条件下放置 35min 后,立刻于激发波长 350nm,发射波长 430nm 条件下测定其荧光值。

#### 6 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 C 含量(mg/100g)} = \frac{(I - I_b) \times c \times 5 \times D}{(I_s - I_{sb}) \times m \times 100} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:  $I$ ——样品荧光值;

$I_b$ ——样品空白溶液荧光值;

$I_s$ ——标样荧光值;

$I_{sb}$ ——标样空白溶液荧光值;

$c$ ——标样质量浓度,mg/mL;

$D$ ——样品稀释倍数;

$m$ ——样品的质量, g。

#### 7 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 10%。

## 前 言

本标准等同采用美国公职分析化学师协会(AOAC)方法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:张玉杰、王芸、杨金宝。



婴幼儿配方食品和乳粉  
游离生物素的测定Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of free biotin content

## 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 方法原理

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:光解陈 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,蒸馏水 1000mL, pH6.8±0.2(25℃)。

3.4.2 乳酸杆菌肉汤培养基:光解陈 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,蒸馏水 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 2mg, 泛酸钙 2mg, 盐酸吡哆醇 2mg, p-氨基苯甲酸 200μg, 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。迅速将灭菌管冷却, 避免颜色形成。贮存于冰箱中。

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50μg/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50μg/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),用水稀释到1000mL,再分别吸此稀释溶液各1mL,一个稀释到500mL,作为高浓度标准溶液,一个稀释到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℃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B<sub>12</sub>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 <sup>1)</sup> , 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

按表2顺序加蒸馏水、样品溶液和维生素B<sub>12</sub>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远, 在灭菌锅中都可产生不良影响)。121℃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℃ 之间选择一个恒定温度(±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

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

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%。

## 前 言

本标准参照瑞士雀巢公司的方法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:雀巢(中国)投资服务有限公司、国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司。

本标准主要起草人:张福才。



婴幼儿配方食品和乳粉  
胆碱的测定

GB/T 5413.20—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of choline

1 范围

本标准规定了胆碱的测定。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中胆碱的测定。

本方法最低检测限度约为 2mg/100g。

2 方法原理

试样经酸解,过滤,酶氧化后,比色测定。

3 试剂

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 0.05mol/L Tris 缓冲液(pH8.0):含质量分数 0.05%的苯酚。

在注入约 500mL 蒸馏水的 1000mL 容量瓶中溶入 6.057g 三羟甲基氨基甲烷和 0.5g 苯酚,再用蒸馏水稀释至刻度。如需要可用 6mol/L 的盐酸调 pH 至 8.0。

3.2 用于酶反应的发色剂

在一个 50mL 容量瓶内溶入 7.81mg 胆碱氧化酶(12.8U/mg),1.31 mg 过氧化酶(190U/mg)和 7.5mg 4-氨基安替比林,用 Tris 缓冲溶液(3.1)稀释至刻度。

3.3 标准溶液:含胆碱氢氧化物 250 $\mu$ g/mL。

在 100mL 容量瓶中溶入 523mg 胆碱酒石酸氢盐,用蒸馏水稀释至刻度。用刻度吸管吸取该溶液 10mL 于 100mL 容量瓶中并用蒸馏水稀释至刻度。

3.4 氢氧化钠溶液:质量分数为 60%。

3.5 盐酸:c(HCl)为 3mol/L。

3.6 盐酸:c(HCl)为 1mol/L。

4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 回流抽提器。

4.2 层析柱,长 25cm,内径 1cm。

4.3 分光光度计。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施



## 5 操作步骤

### 5.1 准备试样

用混合或研磨的方法将样品均匀化,以 0.01g 的精确度准确称量样品,使其胆碱含量约为 1~10mg (以氢氧化物计算)。

#### 5.1.1 固体样品

称取 5g 混合均匀的样品于 250mL 的平底磨口烧瓶中,加入 30mL 盐酸(3.6),搅拌。

#### 5.1.2 液体样品

称取 20g 混合均匀的样品于 250mL 平底磨口烧瓶中,加入 10mL 盐酸(3.5),搅拌。

### 5.2 水解

将装有样品的容器与回流冷凝器连接,在 70℃ 水浴中加热 5h,同时磁力搅拌。冷却。用氢氧化钠溶液(3.4)调 pH3.4~3.6。若必要的话再次冷却,并转入 50mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。

### 5.3 过滤

过滤水解液(5.2)。滤液应是澄清的,如果不澄清,通过 0.45μm 的滤膜再次过滤。

如果因样品的性质得不到澄清滤液,或者过滤困难,建议调 pH 值至 4~4.5,而不是 3.4~3.6(见 5.2)。

### 5.4 酶反应

每个试样准备 3 支试管(A,B,C),按表 1 加入试剂。

表 1

mL

试 剂	试管 A 试剂空白	试管 B 滤液空白	试管 C 试样
待分析滤液	—	0.100	0.100
蒸馏水	0.100	3.00	—
发色剂	3.00	—	3.00

用密封保护膜盖住试管,振荡。把试管置于 37℃ 水浴中保温反应 10min。

### 5.5 比色测定

调整分光光度计波长至 505nm,用蒸馏水作空白。

### 5.6 标准曲线

用刻度吸管移 2,4,6,8mL 标准溶液(3.3)于 4 支 10mL 的容量瓶内,用蒸馏水稀释至刻度。

准备 6 支试管,一个试管用作试剂空白(A),另五支试管由 1 至 5 编号,分别用于标准溶液和标准溶液的四个稀释度。按表 2 加入试剂。

表 2

mL

试剂	管 A	管 1	管 2	管 3	管 4	管 5
稀释度 1(50μg/mL)	—	0.100	—	—	—	—
稀释度 2(100μg/mL)	—	—	0.100	—	—	—
稀释度 3(150μg/mL)	—	—	—	0.100	—	—
稀释度 4(200μg/mL)	—	—	—	—	0.100	—
标准溶液(250μg/mL)	—	—	—	—	—	0.100
蒸馏水	0.100	—	—	—	—	—
发色剂	3	3	3	3	3	3

用密封保护膜盖住试管,振荡,置试管于 37℃ 水浴中保温反应 10min,然后按 5.5 以后的步骤操作。

## 6 分析结果的表述

### 6.1 净透光率的计算

通常非新鲜配制的试剂会产生轻微的颜色,且由于水解作用滤液也不是无色的,为了除去这些干扰因素,应从全透光率中减去各自的空白透光率(管 A 和管 B)。

$$A = A_{\text{tot}} - A_{\text{bl}} - A_{\text{ex}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $A$ ——净透光率;

$A_{\text{tot}}$ ——全透光率(管 C);

$A_{\text{bl}}$ ——试剂透光率(管 A);

$A_{\text{ex}}$ ——抽提液透光率(管 B)。

$A_{\text{bl}}$ 和  $A_{\text{ex}}$ 不应大于全透光率的 20%,对于标准曲线, $A_{\text{ex}}=0$ 。

### 6.2 结果的计算

在标准曲线上查出净吸光值的位置,并记下相应的浓度  $c$ ,以每 100g 样品中胆碱氢氧化物的毫克数表示的胆碱含量,按式(2)计算:

$$\text{样品中胆碱的含量(mg/100g)} = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:  $c$ ——自标准曲线上查得的胆碱浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

$V$ ——水解液被稀释的体积(通常为 50mL), mL;

$m$ ——样品的质量, g。

## 7 允许差

用同一方法对同一样品,在同样操作条件下(同一操作者,同样的仪器,同一实验室,较短的时间间隔),测得的两次独立结果差值不应超过两次结果平均值的 8%。

## 前 言

金属含量的测定一般采用化学法和原子吸收光谱法,但由于化学法操作繁琐,干扰因素多,某些项目测定结果重现性差等原因,目前仍普遍采用原子吸收光谱法。本标准等效采用美国公职分析化学师协会(AOAC)方法。测定中样品处理简单,重现性好。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王心祥、姜金斗、王芸、孙涛、袁硕。

美析

MACY

MACY INST

光度计系列生产

www.macylab.com TEL:400-6

婴幼儿配方食品和乳粉  
钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰的测定

GB/T 5413.21—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of calcium, iron, zinc, sodium,  
potassium, magnesium, copper and manganese

1 范围

本标准规定了用原子吸收分光光度法测定钾、钠、钙、镁、锌、铁、铜和锰的方法。  
本标准适用于各种婴幼儿配方食品和乳粉中钾、钠、钙、镁、锌、铁、铜和锰的测定。

2 方法提要

样品经干灰化,分解有机质后,加酸使灰分中的无机离子全部溶解,直接吸入空气-乙炔火焰中原子化,并在光路中分别测定钾、钠、钙、镁、锌、铁、铜和锰原子对特定波长谱线的吸收。测定钙、镁时,需用铜作释放剂,以消除磷酸等的干扰。

3 试剂

实验用水为二级水,试剂均为优级纯。

3.1 浓盐酸。

3.2 盐酸:体积分数为2%。

3.3 盐酸:体积比1:4。

3.4 硝酸:体积比1:1。

3.5 铜溶液:La的浓度为50g/L。

称取29.32g氧化铜(La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),用25mL去离子水湿润后,慢慢仔细地添加125mL浓盐酸使氧化铜溶解后,用去离子水稀释至500mL。

3.6 钾标准贮备液:K<sup>+</sup>的质量浓度1000μg/mL。

称取干燥的氯化钾(分子量74.55,光谱纯)1.9067g,用盐酸(3.2)溶解,并定容于1000mL容量瓶中。

3.7 钠标准贮备液:Na<sup>+</sup>的质量浓度1000μg/mL。

称取干燥的氯化钠(分子量58.44,光谱纯)2.5420g,用盐酸(3.2)溶解,并定容于1000mL容量瓶中。

3.8 钙标准贮备液:Ca<sup>2+</sup>的质量浓度1000μg/mL。

称取干燥的碳酸钙(分子量100.05,光谱纯)2.4963g,用盐酸(3.3)100mL溶解,并定容于1000mL容量瓶中。

3.9 镁标准贮备液:Mg<sup>2+</sup>的质量浓度1000μg/mL。

称取纯镁(光谱纯)1.0000g,用硝酸(3.4)40mL溶解,用水定容于1000mL容量瓶中。

国家技术监督局1997-05-28批准

1998-09-01实施

- 3.10 锌标准储备液;  $Zn^{+2}$  的质量浓度  $1000\mu\text{g/mL}$ 。  
称取金属锌(光谱纯)  $1.0000\text{g}$ , 用硝酸(3.4)  $40\text{mL}$  溶解, 用水定容于  $1000\text{mL}$  容量瓶中。
- 3.11 铁标准储备液;  $Fe^{+3}$  的质量浓度  $1000\mu\text{g/mL}$ 。  
称取金属铁粉(光谱纯)  $1.0000\text{g}$ , 用硝酸(3.4)  $40\text{mL}$  溶解, 用水定容于  $1000\text{mL}$  容量瓶中。
- 3.12 铜标准储备液;  $Cu^{+2}$  的质量浓度  $1000\mu\text{g/mL}$ 。  
称取金属铜(光谱纯)  $1.0000\text{g}$ , 用硝酸(3.4)  $40\text{mL}$  溶解后, 再用水定容于  $1000\text{mL}$  容量瓶中。
- 3.13 锰标准储备液;  $Mn^{+2}$  的质量浓度  $1000\mu\text{g/mL}$ 。  
称取金属锰(光谱纯)  $1.0000\text{g}$ , 用硝酸(3.4)  $40\text{mL}$  溶解, 用水定容于  $1000\text{mL}$  容量瓶中。
- 3.14 各离子的标准中间液, 质量浓度均为  $100\mu\text{g/mL}$ 。  
分别吸取 3.6、3.7、3.8、3.9、3.10、3.11、3.12 和 3.13 标准储备液  $25\text{mL}$  于八个  $250\text{mL}$  容量瓶中, 用盐酸(3.2)定容, 得到上述离子的标准中间液。

#### 4 仪器

常用实验室仪器及:

- 4.1 原子吸收分光光度计。  
4.2 钾、钠、钙、镁、锌、铁、铜、锰空心阴极灯。  
4.3 钢瓶乙炔气和空气压缩机。  
4.4 石英坩埚或瓷坩埚。  
4.5 高温炉。

#### 5 操作步骤

##### 5.1 标准曲线

##### 5.1.1 标准混合溶液的配制

按表 1 给出的体积, 配制三个混合标准工作液。即分别吸取铜、锰标准中间液(3.14)  $10\text{mL}$  于  $100\text{mL}$  容量瓶中定容, 即两离子的质量浓度为  $10\mu\text{g/mL}$ , 再按表 1 吸取该液, 测定铁、锌含量时按表 1 分别吸取标准中间液(3.14)于  $100\text{mL}$  容量瓶中, 用盐酸(3.2)定容即为 5 个铜锰铁锌混合标准溶液; 测定钙、镁含量时按表 1 吸取标准中间液(3.14)于  $100\text{mL}$  容量瓶中, 加  $2\text{mL}$  铜溶液用盐酸(3.2)定容即为钙镁标准混合液; 测定钾、钠含量时按钙、镁步骤操作即为钾钠标准混合溶液, 各元素浓度如表 2。

表 1 配制混合标准溶液所取各元素标准中间液的体积  $\text{mL}$

序号	K	Ca	Na	Mg	Zn	Fe	Cu	Mn
1	1	2.5	1	0.5	0.5	2.0	1	1
2	2	5	2	1.0	1.0	4.0	2	2
3	3	10	3	1.5	1.5	6.0	4	4
4	4	15	4	2.0	2.0	8.0	6	6
5	5	20	5	2.5	2.5	10.0	8	8

表 2 混合标准溶液各元素的浓度  $\mu\text{g/mL}$

序号	K	Ca	Na	Mg	Zn	Fe	Cu	Mn
1	1	2.5	1	0.5	0.5	2.0	0.1	0.1
2	2	5	2	1.0	1.0	4.0	0.2	0.2
3	3	10	3	1.5	1.5	6.0	0.4	0.4
4	4	15	4	2.0	2.0	8.0	0.6	0.6
5	5	20	5	2.5	2.5	10.0	0.8	0.8

### 5.1.2 标准曲线的绘制

按照仪器说明书将仪器工作条件调整到测定各元素最佳状态,选用灵敏吸收线 K 766.5nm、Ca 422.7nm、Na 588.9nm、Mg 285.2nm、Fe 248.3nm、Cu 324.7nm、Mn 279.5nm、Zn 213.9nm 将仪器调好预热后,用毛细管吸喷盐酸(3.2)溶液,测定钾钠钙镁时用含铜 1g/L 的体积分数为 2% 的盐酸(HCl)调零。分别测定混合标准溶液中各离子的透光率,对各元素含量绘制标准曲线或计算回归方程。

### 5.2 样品处理

精确称取 5.0000g 样品于坩埚(4.4)中,在电炉上微火灰化至不灰烟,再移入高温炉(4.5)中升温至 490℃ 使样品灰化成白色灰烬。如果有黑色炭粒,冷却后,则滴加少许 1:1 的硝酸(3.4)湿润。在电炉上小火烘干后,再移入 490℃ 高温炉中继续灰化成白色灰烬,取出,冷却至室温,加 1:4 的盐酸 5mL,在电炉上加热使灰烬充分溶解,冷却到室温后,移入 50mL 容量瓶中,用去离子水定容,同时处理一个空白样品。

### 5.3 样品的测定

调整好仪器最佳状态,用相应的盐酸溶液(3.2)调零后,按下面的方式测定样品的透光率及试剂空白。

#### 5.3.1 钠的测定

从 50mL 样液中吸取 1mL 于 100mL 容量瓶中,加 2mL 铜溶液,用盐酸(3.2)定容,上机测定。

#### 5.3.2 钾的测定

从测定钠的 100mL 容量瓶中吸取 10mL 于 50mL 容量瓶中,加 1mL 铜溶液,用盐酸(3.2)定容,上机测定。

#### 5.3.3 钙、镁的测定

从 50mL 样液中吸取 1mL 于 50mL 容量瓶中,加铜溶液 1mL,用盐酸(3.2)定容,上机测定。

#### 5.3.4 铁、锰、锌、铜的测定

从 50mL 样液中吸取 5mL 于 25mL 容量瓶中,用盐酸(3.2)定容,上机测定锌、铁、锰、铜用 50mL 样液直接上机测定。

### 6 分析结果的表述

$$\text{样品中元素含量(mg/100g)} = \frac{(c_1 - c_2) \times V \times A}{m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:  $c_1$ ——测定液中元素的浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

$c_2$ ——测定空白液中元素的浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

$V$ ——样液体积,  $\text{mL}$ ;

$A$ ——样液稀释倍数;

$m$ ——样品的质量,  $\text{g}$ 。

### 7 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 5%。

## 前 言

以往婴幼儿配方食品和乳粉中磷含量的测定采用的是钼蓝比色法,但因该方法操作步骤较繁杂,特别是样品处理中磷损失严重,致使测定结果不能准确反映样品中磷的真实含量。本标准给出的钒钼黄比色法,操作简单快速,样品处理改用湿法而避免了磷的损失,经大量试验证明,测定结果准确,重现性好,一般相对误差在3%以内。

本系列标准从实施之日起,代替GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:姜金斗、王心祥、王芸。



婴幼儿配方食品和乳粉  
磷的测定

GB/T 5413.22—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of phosphorus

## 1 范围

本标准规定了磷的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中磷的测定。

## 2 方法提要

样品经湿法消化后定容，在硝酸溶液中，磷与钒钼酸铵生成黄色络合物( $P_2O_5 \cdot V_2O_5 \cdot 22MoO_3 \cdot 3H_2O$ )，其黄色的深浅可用比色法比色测定，其测定范围为磷的浓度在  $2 \sim 20 \mu\text{g/mL}$  之间。

## 3 试剂

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 硝酸：优级纯。

3.2 硫酸：优级纯。

3.3 高氯酸：优级纯。

3.4 钒钼酸铵试剂

A 液：25g 钼酸铵 $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ ，溶于 400mL 水中。

B 液：1.25g 偏钒酸铵 $(NH_4VO_3)$ 溶于 300mL 沸水中，冷却后加 250mL 浓硝酸，然后将 A 液缓缓倾入 B 液中，不断搅匀，并用水稀释至 1L，贮于棕色瓶中。

3.5 氢氧化钠： $c(\text{NaOH})$ 为 6mol/L。

3.6 二硝基酚指示剂：2g/L

称取 0.2g 2,6-二硝基酚或 2,4-二硝基酚 $[C_6H_3OH(NO_2)_2]$ 溶于 100mL 水中。

3.7 标准储备液：磷的浓度为  $50 \mu\text{g/mL}$

称取 0.2197g 经烘干的磷酸二氢钾(优级纯)，溶于约 400mL 水中，加 25mL  $H^+$ 浓度为 12mol/L 的硫酸，定容至 1L。可长久贮存。

## 4 仪器

常用实验室仪器及：

4.1 电热板。

4.2 分光光度计。



## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

精确称取 0.5000g 样品于 125mL 三角瓶中,加几粒玻璃球,加 10mL 浓硝酸(3.1),然后放在电热板上加热反应。待剧烈反应结束后取下,稍冷却,再加入 5mL 硝酸(3.1),5mL 硫酸(3.2)和 5mL 高氯酸(3.3),重新放置电热板上加热反应,此时应把温度调低些。若消化液变黑,需取下再加 5mL 硝酸(3.1)后继续消化,直到消化液变成无色或淡黄色,且冒出白烟,在消化液剩下 3~5mL 时取下,冷却,定量地转入 50mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,此即为待测液。同时做空白。

### 5.2 标准曲线的绘制

5.2.1 精确吸取磷的标准储备液 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15mL, 分别放入 50mL 容量瓶中,加显色剂定容后磷浓度分别为 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 $\mu$ g/mL。

5.2.2 分别加少量水后,加 2 滴二硝基酚指示剂(3.6),用氢氧化钠溶液(3.5)调至微黄色,再分别加入 10.00mL 钒钼酸铵试剂(3.4),用水定容至刻度。在 25~30 $^{\circ}$ C 下显色 15min。

5.2.3 用 1cm 光径比色皿,波长 440nm,于分光光度计上测定吸光值,以吸光值为纵坐标,磷含量为横坐标绘制标准曲线或计算回归方程。

### 5.3 样品测定

精确吸取样液(5.1)10mL(含磷 0.2~0.75mg)于 50mL 容量瓶中,以空白溶液调零,其余操作步骤同 5.2.2。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中磷的含量(mg/100g)} = \frac{c \times V \times A}{m \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中:  $c$ ——从标准曲线中查得的比色液的浓度,  $\mu$ g/mL;

$V$ ——样液体积(即 50mL);

$A$ ——样液稀释倍数;

$m$ ——样品的质量, g。

## 7 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 5%。

## 前 言

碘的测定通常采用分光光度法和离子选择性电极法,但对于婴幼儿配方食品和乳粉这样成分复杂,有机质含量高的食品中碘的测定,其灵敏度却不够理想。本标准采用的气相色谱法是在参考了大量国内外文献的基础上,根据婴幼儿配方食品和乳粉的特点,经过反复实验、验证而确定的,具有操作简便、快速、灵敏度高的特点。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:杨君、王芸、杨金宝。



Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of iodine content

## 1 范围

本标准规定了用气相色谱法测定碘的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中碘的测定。

## 2 方法提要

把样品中的碘衍生成容易气化的衍生物后,经气相色谱分离,电子捕获检测器定量测定样品中碘的含量。

## 3 试剂

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 高峰氏淀粉酶(Taka-Diastase)。

3.2 碘化钾:光谱纯。

3.3 亚铁氰化钾: $c[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 为 109g/L。称取 109g 亚铁氰化钾,用蒸馏水定容于 1000mL 容量瓶中。

3.4 乙酸锌: $c(\text{ZnAc}_2)$ 为 219g/L。称取 219g 乙酸锌,用蒸馏水定容于 1000mL 容量瓶中。

3.5 浓硫酸。

3.6 甲乙酮:色谱纯。

3.7 双氧水:体积分数为 3.5%。

3.8 正己烷:色谱纯。

3.9 无水硫酸钠。

3.10 标准溶液

3.10.1 碘化钾标准贮备液:浓度为 1mg/mL。

准确称取 131mg 碘化钾,用蒸馏水溶解并定容至 100mL,冷藏保存。

3.10.2 标准中间液:

取 10mL 标准贮备液,定容至 100mL,其浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;再取 10mL 前述标准中间液,定容至 100mL,其浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.10.3 碘化钾标准工作液:浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

取浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准中间液 10mL,定容至 50mL。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

- 4.1 分液漏斗:100mL。
- 4.2 容量瓶:50mL。
- 4.3 气相色谱仪。
- 4.4 电子捕获检测器。
- 4.5 色谱柱:2m,3%OV-101 100~200 目,长 2m 的不锈钢柱,或同等性能的柱子。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

#### 5.1.1 含淀粉的样品

准确称取样品 5g 于三角瓶中,放入 50mL 容量瓶中,加入 0.5g 高峰氏淀粉酶(3.1),再加入 30mL 45~50℃的蒸馏水,混合均匀后,用氮气排除瓶中空气,盖上瓶盖,置 45℃烘箱内 30min。

#### 5.1.2 不含淀粉的样品

准确称取 5g 于烧杯中,用 30mL 65℃的热水溶解,转入 50mL 容量瓶中。

### 5.2 测定液的制备

5.2.1 于上述处理过的样品溶液中加入 5mL 亚铁氰化钾(3.3)和 5mL 乙酸锌(3.4),并定容至刻度线,充分振摇后静置 10min。

5.2.2 过滤。吸取 10mL 滤液于 100mL 分液漏斗中,加 10mL 水。

5.2.3 加入 0.7mL 浓硫酸(3.5),0.5mL 甲乙酮(3.6),2mL 体积分数为 3.5%的双氧水(3.7),充分混匀后,静置 20min。

5.2.4 加入 20mL 正己烷(3.8)萃取,静置分层后,将水相移入另一分液漏斗,再次萃取。

5.2.5 合并有机相,加水 20mL,水洗后静置分层,放去水相。

5.2.6 用无水硫酸钠(3.9)干燥有机相后移入 50mL 容量瓶中并定容,此即为待测液。

标准工作液也按上述步骤制备。

### 5.3 样品测定

#### 5.3.1 测定条件

- a) 柱温:100℃;
- b) 进样口温度:150℃;
- c) 检测器 ECD 温度 200℃;
- d) 进样体积:2.0μL;
- e) 灵敏度:10<sup>-10</sup>;
- f) 衰减:S;
- g) 氮气流速:20mL/min。

#### 5.3.2 定性测定

根据保留时间定性。改变色谱条件,如柱温度、载气流速,使标准组分的保留时间发生改变。如果样品中的某个峰随标准样品中的某个峰的保留时间有同样的改变,即证明样品中含有与标样相同的某个组分。

#### 5.3.3 定量测定

外标定量法。

注射一定量的经 5.2 步骤制备过的标准工作液进入气相色谱仪,得到碘的峰面积  $A_i$ ;注射等体积的样品待测液进入气相色谱仪,得到样品碘的峰面积  $B_i$ 。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中碘的含量}(\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{100 \times B_i \times c \times V}{A_i \times m} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中： $B_i$ ——样品中组分  $i$ (碘)对应峰面积；  
 $c$ ——标准样品中组分  $i$  的浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；  
 $V$ ——待测样品的总体积， $\text{mL}$ ；  
 $A_i$ ——标准工作液中组分  $i$  的峰面积；  
 $m$ ——样品的质量， $\text{g}$ 。

## 7 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 5%。



## 前 言

本标准给出了两种方法。方法一为采用 GB/T 12457—90《食品中氯化钠的测定方法》第 3 章方法。方法二是铬酸钾指示剂法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、姜金斗、袁硕、田间。



婴幼儿配方食品和乳粉  
氯的测定

GB/T 5413.24—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of chlorine

1 范围

本标准规定了氯的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中氯的测定。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 12457—90 食品中氯化钠的测定方法

方法一 电位滴定法

同 GB/T 12457—90 中第 3 章。

方法二 铬酸钾指示剂法

3 方法提要

有机酸沉淀样品中的蛋白质,用硝酸银溶液滴定样品中的氯离子,生成氯化银沉淀;过量的硝酸银与指示剂铬酸钾反应生成铬酸银使溶液呈桔红色即为滴定终点。由硝酸银溶液的消耗量计算样品中的氯含量。

4 试剂

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。

4.1 三氯乙酸溶液:500g/L。

4.2 标准氯化钠溶液: $c(\text{NaCl})$ 为 0.1mol/L。准确称取烘干(130℃)2h 的氯化钠 5.8440g 于 1000mL 容量瓶中,用去离子水溶解并定容。

4.3 铬酸钾溶液: $c(\text{KCrO}_4)$ 为 50g/L,作指示剂。

4.4 硝酸银溶液: $c(\text{AgNO}_3)$ 为 0.05mol/L。

标定:取 10mL 标准氯化钠溶液(4.2)于 125mL 容量瓶中,加 10 滴铬酸钾指示剂(4.3),用上述硝酸银溶液滴定,根据消耗的硝酸银溶液体积,计算硝酸银溶液的实际浓度。

4.5 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH})$ 50g/L。

4.6 酚酞乙醇指示剂:10g/L 乙醇。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

4.7 硝酸溶液： $c(\text{HNO}_3)0.1\text{mol/L}$ 。

## 5 仪器

常用实验室仪器及：

- 5.1 分析天平。
- 5.2 容量瓶,100mL。
- 5.3 三角瓶,125mL。
- 5.4 棕色滴定管,10mL。

## 6 操作步骤

- 6.1 准确称取样品 10.0000g 于小烧杯中,加 50mL 水溶解后移入 100mL 容量瓶(5.2)中,加三氯乙酸溶液(4.1)10mL 混匀定容,静置约 1min 后过滤。
- 6.2 吸取滤液 10mL 于 125mL 三角瓶(5.3)中,加三滴酚酞指示剂(4.6),用氢氧化钠溶液(4.5)调节至微红色。用硝酸溶液(4.7)回调至红色刚好退去。再加 10 滴铬酸钾指示剂(4.3)后用硝酸银溶液(4.4)滴定至桔红色 1min 内不褪色,即为终点,滴定时在底端放一黄色纸,更易于辨认终点。同时做空白试验。

## 7 分析结果的表述

$$\text{样品中氯含量}(\text{mg}/100\text{g}) = (V - V_0) \times c \times 35.5 \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{100}{m} \dots\dots\dots(4)$$

式中： $V$ ——滴定样液所消耗的硝酸银溶液的体积,mL；

$V_0$ ——空白液所消耗的硝酸银溶液的体积,mL；

$c$ ——硝酸银溶液的浓度,mol/L；

$V_1$ ——样液体积,mL；

$V_2$ ——吸取滤液体积,mL；

$m$ ——样品的质量,g。

计算结果精确至小数点后第二位。

## 8 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 5%。



## 前 言

本标准等同采用美国公职分析化学师协会(AOAC)方法,测定的是具有生物效价的肌醇含量。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:张玉杰、王芸、房玉国、王克新。



婴幼儿配方食品和乳粉  
肌醇的测定

GB/T 5413.25—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of inositol

1 范围

本标准规定了肌醇的测定方法。

本标准方法一适用于婴幼儿配方食品和乳粉中肌醇的测定,方法二适于乳粉中肌醇的测定。

方法一 微生物法

2 方法原理

通过 *Saccharomyces uvarum* 的生长情况来评价肌醇的含量。

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 盐酸:体积比为 1:1

将体积分数为 37% 的浓盐酸 50mL 用水稀释至 100mL。

3.2 氢氧化钠:c(NaOH)为 1mol/L

将 40g 氢氧化钠溶解于水中,稀释至 1000mL。

3.3 肌醇标样:无水晶体。

3.4 菌种

*Saccharomyces uvarum*。

3.5 培养基

3.5.1 链孢霉菌琼脂培养基:3号蛋白胨 5g,酵母浸膏 5g,麦芽糖 40g,琼脂 15g。

3.5.2 肌醇测定用培养基:葡萄糖 100g,柠檬酸钾 10g,柠檬酸 2g,磷酸二氢钾 1.1g,氯化钾 0.85g,硫酸镁 0.25g,氯化钙 0.25g,硫酸锰 50mg,氯化亚铁 50mg,DL-色氨酸 80mg,L-胱氨酸 0.1g,L-异亮氨酸 0.5g,L-赖氨酸 0.5g,L-蛋氨酸 0.2g,DL-苯基丙氨酸 0.2g,L-酪氨酸 0.2g,L-天门冬酰胺 0.8g,DL-天门冬氨酸 0.2g,DL-丝氨酸 0.1g,甘氨酸 0.2g,DL-苏氨酸 0.4g,L-缬氨酸 0.5g,L-组氨酸 0.124g,L-脯氨酸 0.2g,DL-丙氨酸 0.4g,L-谷氨酸 0.6g,L-精氨酸 0.48g,盐酸硫胺素 500 $\mu$ g,生物素 16 $\mu$ g,泛酸钙 5mg,盐酸吡哆醇 1mg,加蒸馏水至 1000mL,pH5.2 $\pm$ 0.2(25 $^{\circ}$ C)。

4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 pH 计。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

4.2 250mL 圆底烧瓶,与冷凝器连接的锥形玻璃接头。

4.3 比色仪。

## 5 样品制备

### 5.1 贮备菌种的制备

5.1.1 从纯菌种 *S. uvarum* 中转接 2 个以上已制备好的麦芽浸出汁琼脂斜面。30℃培养 16~24h。贮于冰箱中,保存期不要超过 2 周,然后再转接到新的琼脂斜面上。

#### 5.1.2 接种的准备

最好在使用的当天从贮备菌种中转接到新配制的麦芽浸出汁琼脂斜面上,30℃培养 16~24h。用接种环无菌地转接该菌种到一个灭菌生理盐水中,直到得到一定浓度菌体细胞的悬浮液。为了测定,制备一个酵母菌悬浮水溶液,这个悬浮液中酵母菌的浓度在 0.1mg/mL。分光光度计事先用水调到 100%透光率,然后测定这个“标准”酵母菌的透光率。将新接种斜面中的菌体细胞移入到无菌生理盐水中,其浓度直到达到与上述标准溶液具有相同的透光率为止。

### 5.2 标准溶液

#### 5.2.1 标准贮备液,肌醇的浓度为 0.2mg/mL。

称取 100mg 肌醇(该肌醇标样已放在干燥器中干燥 24h),于容量瓶中用水稀释至 500mL。贮于冰箱。

#### 5.2.2 标准工作液,肌醇的浓度为 2μg/mL。

吸取 5mL(5.2.1)溶液,用水稀至 500mL,定容。当天制备。

## 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,这些样品中约含肌醇 0.5mg,移入 250mL 圆底烧瓶中,加 100mL 盐酸(1:1)(3.1),继续 6.1.3 步骤。

#### 6.1.2 液体样品。

吸一定量样品,这些样品中约含肌醇 0.5mg,加 100mL 盐酸(3.1),继续 6.1.3 步骤。

#### 6.1.3 将装样品的圆底烧杯与冷凝器联结,经过 6h,通过蒸馏将盐酸除去。

将剩余物用蒸馏水冲到烧杯中,用 1mol/L 氢氧化钠将溶液的 pH 值调至 5.1±0.1。稀释至 250mL,过滤,弃去前部几毫升。这个溶液肌醇的浓度均为 2μg/mL。

### 6.2 标准曲线

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准溶液于培养管中,一式三份。

表 1

试管号 No.	1	2	3	4	5	6	7
蒸馏水, mL	5	5	4	3	2	1	0
标准溶液, mL	0	0	1	2	3	4	5

### 6.3 测定液

按表 2 顺序加入蒸馏水、样品溶液于培养管中,一式三份。

表 2

试管号 No.	1	2	3	4
蒸馏水, mL	4	3	2	1
样品溶液, mL	1	2	3	4

#### 6.4 热处理

用棉塞或不锈钢帽盖住所有试管,100℃蒸汽蒸 10min。

#### 6.5 接种

冷却试管至 30℃以下。无菌添加接种物于基础贮备培养基中,以每 100mL 添加 2mL 的比例添加,充分混合,将上述已接种的培养基无菌加入到 6.2 和 6.3 的每个测定管中,每管加 5mL(其中标准曲线中 No. 1 号试管只加 5mL 未接种的培养基)。

#### 6.6 培养

将试管固定在机械振荡器上,以每分钟振荡 100~200 次的往复运动中,28~30℃之间选择一个恒定温度(±0.5℃)培养 22~24h。

#### 6.7 测定

从振荡器上取下试管,于 100℃蒸 5min 或每管加 1 滴杀菌剂(Thorol),以使其停止生长。

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的预测,未接种管是清的,标准溶液和样品中应无其他微生物生长。

充分混合每一个试管(也可以加一滴消泡剂),将反应液加到比色皿内,搅拌内容物,将比色皿放入到分光光度计的比色池内,波长为 540~660nm,读出透光率或吸光度,稳定 30s,每个试管稳定时间要相同。

对于未接种管,将其透光率调到 100%(或吸光度为 0),读出其他接种空白管的读数。

将接种空白管的透光率调到 100%(或吸光度为 0),依次读出其他每个管。

对每个水平的测试溶液,计算每毫升中维生素的含量,计算所得值的平均数,每个管测得值不得超过该平均值的±15%。如果所得到的管数,少于所测定的四种水平的稀释液的管数的 2/3,用于计算样品浓度的数据是不充分的。如果剩余管数是原来管数的 2/3 或更多,则可根据平均值计算其样品的含量。

注:不可使用金属帽(除了不锈钢盖),这是由于试管在培养振荡过程中有金属污染的可能性。

### 7 分析结果的表述

$$\text{样品中肌醇的含量(mg/100g 或 mg/100mL)} = \frac{X}{m} \times \frac{250}{1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中: X——测定管中每毫升测试溶液中肌醇含量的平均值,μg;

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%。

#### 方法二 气相色谱法

### 9 方法提要

样品中的肌醇与衍生剂反应后,经气相色谱时行分离定量。

### 10 试剂

10.1 N-三甲基硅基咪唑。

10.2 三甲基氯硅烷。

### 11 仪器

11.1 气相色谱仪:FID 检测器。

11.2 色谱柱:50%Phenylmethyloxane,Db-17(J&w)。0.32mm id×30m 0.25μm。

## 12 操作步骤

12.1 准确称取 1g 样品于烧杯中,用温水溶解,转至 100mL 容量瓶中,定容。取 5.0mL 该溶液放入小试管中作为测定液。

12.2 准确称取 50mg 肌醇标样于小烧杯中,用水溶解,转至 100mL 容量瓶中,定容。用吸量管取该溶液 5mL 于一 100mL 容量瓶中,用水定容。取此溶液 2mL 于小试管中。

12.3 将上述分别含有样品和标准溶液的试管冷冻干燥。

于每个试管中加 1mL 内标溶液(每毫升吡啶中含 0.05mg 的葱),盖紧塞子,放置 15min。

于每个试管中加 0.5mL 的 N-三甲基硅基咪唑和 0.2mol/L 的,混合,静置 15min 后进样。

12.4 气相色谱条件:

- a) 柱温:140~260°C(5°C/min);
- b) 检测器:FID;
- c) 检测器温度:280°C;
- d) 进样器:split(1:40);
- e) 进样器温度:280°C;
- f) 进样体积:1μL;
- g) 流速:1.4mL/min。

## 13 分析结果的表述

$$\text{样品中肌醇含量(mg/100g)} = \frac{A_s/A_B}{A_{si}/A_{Bi}} \times \frac{200 \times c \times 200}{m} \dots\dots\dots(6)$$

式中:  $c$ ——标准工作液浓度,μg/mL;

$A_s$ ——样品峰面积;

$A_B$ ——标样峰面积;

$A_{si}$ ——样品内标峰面积;

$A_{Bi}$ ——标样内标峰面积;

$m$ ——样品的质量,g。

## 14 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 5%。

## 前 言

本标准给出的柱后衍生离子色谱法测定牛磺酸是在检索了近10年21篇国外文献的基础上,经过反复实验、验证而制定的。该方法的回收率为100%,变异系数为2.19%。

本系列标准从实施之日起,代替GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:浙江省轻工业研究所。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、国家乳制品质量监督检验中心、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:任一平、黄百芬、陈青俊。



婴幼儿配方食品和乳粉  
牛磺酸的测定

GB/T 5413.26—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of taurine content

## 1 范围

本标准规定了用高压液相色谱法测定牛磺酸的方法。  
本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中牛磺酸的测定。

## 2 方法提要

样品用偏磷酸溶液溶解,经超声波振荡提取、离心、微孔滤膜过滤后,通过钠离子色谱柱分离,再与邻苯二甲醛(OPA)衍生反应,由荧光检测器检测定量。

## 3 试剂

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 偏磷酸溶液: $c(\text{H}_3\text{PO}_2)$ 为10g/L。称取10.0g偏磷酸溶解于1000mL的蒸馏水中。

3.2 流动相:称取柠檬酸三钠19.6g,溶于950mL水中,加入苯酚1mL,用 $\text{H}^+$ 浓度为6mol/L的硝酸调pH值至3.10~3.25,经0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

### 3.3 柱后荧光衍生反应试剂

3.3.1 硼酸钾溶液: $c(\text{K}_3\text{BO}_3)$ 为0.5mol/L。称取硼酸123.6g,氢氧化钾105g,溶解后定容至4L。

3.3.2 邻苯二甲醛(OPA)溶液:称取邻苯二甲醛(OPA)0.60g,用10mL甲醇将邻苯二甲醛(OPA)溶解后,加入2-巯基乙醇0.5mL和Brij-35 0.35g,再加入0.5mol/L的硼酸钾溶液(3.3.1)至1000mL,经0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

3.4 标准溶液:牛磺酸的浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精确称取牛磺酸标准品0.100g,用水定容至100mL,再吸1.0mL此溶液至100mL,定容后经0.3 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

## 4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 分离柱:钠离子氨基酸分离专用柱。

4.2 柱后反应器:氨基酸柱后反应器。

4.3 荧光检测器。

4.4 溶剂泵:流量为0.01~0.09mL/min。

4.5 数据处理系统:积分仪。

4.6 超声波振荡器。

国家技术监督局1997-05-28批准

1998-09-01实施

## 5 操作步骤

- 5.1 精确称取样品 1.0~5.0g(在所称样中牛磺酸的含量不少于 5 $\mu$ g),用 60mL 偏磷酸溶液(3.1)溶解样品,并移入 100mL 容量瓶中。
- 5.2 将样液充分摇动后,放入超声波振荡器中振荡 10~15min,待冷却至室温后,定容至刻度。
- 5.3 取 60mL 经振荡后的样液在 5000r/min 条件下离心 20min。
- 5.4 吸取经离心的样液(上清液)10mL,经 0.3 $\mu$ m 微孔膜过滤,接取中间滤液约 1mL 作进样用。
- 5.5 色谱条件。
- 5.5.1 流动相流速:0.3mL/min。
- 5.5.2 柱温:55 $^{\circ}$ C。
- 5.5.3 邻苯二甲醛(OPA)衍生试剂流速:0.3mL/min。
- 5.5.4 荧光检测器:激发波长:338nm,发射波长:425nm,灵敏度:0.01 AUFS。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中牛磺酸含量(mg/100g)} = \frac{c \times 100 \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $c$ ——仪器测得进样液的浓度, $\mu$ g/mL;  
 $m$ ——样品的质量,g。

## 7 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 5%。



## 前 言

在婴幼儿配方食品中添加 **DHA、EPA** 是近两年的科技成果,对其含量的检测方法尚在探索阶段。本标准给出的方法是在参考了大量国内外文献的基础上,经反复实验、验证而确定的,具有操作简便、快速、灵敏度高的特点。

本系列标准从实施之日起,代替 **GB 5413—85**。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:刘波、杨金宝、王芸。



婴幼儿配方食品和乳粉  
DHA、EPA 的测定

GB/T 5413.27—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of DHA and EPA contents

1 范围

本标准规定了用气相色谱法测定 DHA 和 EPA 的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中 DHA 和 EPA 含量的测定。

2 方法提要

抽提出样品内的脂肪,经甲基化反应后,以气相色谱,火焰离子化检测器定量测定样品中的 DHA 和 EPA 的含量。

3 试剂

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 高峰氏淀粉酶(Taka-Diastase)。

3.2 氨水:体积分数 $\leq 25\%$ 。

3.3 乙醇:体积分数 $\geq 95\%$ 。

3.4 乙醚。

3.5 石油醚:沸程,30~60℃。

3.6 正己烷:色谱纯。

3.7 氢氧化钾的甲醇溶液: $c(\text{KOH})$ 为 4mol/L,使用无水甲醇。

3.8 标准溶液

3.8.1 标准贮备液:准确称取 1.00g 标准鱼油(EPA 163.9mg/g, DHA 135.30mg/g),用正己烷溶解并定容至 50mL (EPA 的浓度为 3.2678mg/mL, DHA 的浓度为 2.7060mg/mL),冷冻保存。

3.8.2 标准工作液:取标准贮备液 1.00mL,用正己烷稀释并定容至 10mL (EPA 的浓度为 0.3268mg/mL, DHA 的浓度为 0.2706mg/mL),使用前配制,以防止溶剂挥发而使浓度改变。

4 仪器和玻璃器皿

常用实验室仪器及:

4.1 毛氏抽脂瓶。

4.2 离心机。

4.3 水浴锅。

4.4 振荡器。

4.5 气相色谱仪。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

4.6 火焰离子化检测器。

4.7 色谱柱:2m,10% EGSS, GAS-CHROM QM/100~200 目,不锈钢柱。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

#### 5.1.1 含淀粉样品

准确称取 1.0000g 样品放入毛氏抽脂瓶中,加入 0.1gTaka 淀粉酶,再加入 10mL45~50℃的蒸馏水,混合均匀后,用氮气排除瓶中空气,盖上瓶塞,置 45℃烘箱内 30min,取出冷却室温。

#### 5.1.2 不含淀粉样品

准确称取样品 1.0000g,放入毛氏抽脂瓶(4.1)中,用 10mL65℃的热水溶解,振摇,使样品完全分散,水冷至室温。

### 5.2 测定液的制备

5.2.1 于上述样品溶液中加入 2mL 体积分数为 25%的氨水(3.2),置于 65℃水浴(3.3)中 15min,取出,轻摇,冷至室温。

5.2.2 加入 10mL 乙醇(3.3),混匀。加入 25mL 乙醚(3.4),塞上塞子振摇 1min。加入 25mL 石油醚(3.5),塞上塞子振摇 1min。再加入 25mL 石油醚,塞上塞子振摇 1min。离心或静止,使醚层、水层分开。有机层转入烧瓶中。第二次提取加入的试剂为 5mL 乙醇、15mL 乙醚、15mL 石油醚,操作同前。第三次提取不加乙醇,只用 15mL 乙醚和 15mL 石油醚,如上操作。

5.2.3 把提取的醚液合并,减压浓缩至近干,用正己烷溶解残留物并定容至 10mL,摇匀。准确吸取 2mL 此液于 10mL 带盖离心管中,加入 0.2mL 氢氧化钾的甲醇溶液(3.7),振摇 1min 以上,放置 10min (甲基化反应)。如果有机层混浊,可离心使之澄清。此有机层即为样品待测液。

### 5.3 测定

#### 5.3.1 测定条件

- a) 进样器温度:230℃;
- b) 检测器 FID 温度:250℃;
- c) 进样体积:2.0μL;
- d) 灵敏度:10<sup>-9</sup>;
- e) 衰减:S;
- f) 氮气流速:50mL/min;氢气流速:25mL/min;空气流速:300mL/min;
- g) 柱温:190℃。

#### 5.3.2 定性测定

根据保留时间定性。改变色谱条件,如柱温度、载气流速,使标准组分 EPA 和 DHA 的保留时间发生改变。如果样品中的某个峰随标准品中的某个峰的保留时间有同样的改变,即证明样品中含有与标样相同的某个组分。

#### 5.3.3 定量测定

外标定量法。

注射一定量的标准工作液进入气相色谱仪,得到 EPA 和 DHA 的峰面积  $A_i$ ;注射等体积的样品待测液进入色谱仪,得到样品中 EPA 和 DHA 的峰面积  $B_i$ 。

## 6 分析结果的表述

$$\text{样品中 EPA 或 DHA 的含量 (mg/100g)} = \frac{100B_i c_s V}{A_i m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $B_i$  ——样品中组分  $i$ (EPA 或 DHA)对应峰面积;

$c_{si}$  ——标准样中组分  $i$  的质量浓度,mg/mL;

$V$  ——待测样品的总体积,mL;

$A_i$  ——标准工作液中组分  $i$  的峰面积;

$m$  ——样品的质量,g。

## 7 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%。



## 前 言

本标准给出了两种方法。方法一为等效采用国际乳品联合会标准 **IDF86:1978**《乳粉——滴定酸度的测定(基准法)》;方法二为等效采用国际乳品联合会标准 **IDF81:1981**《乳粉——滴定酸度的测定(常规法)》。

本标准方法一为仲裁法。

本系列标准从实施之日起,代替 **GB 5413—85**。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:黄敏、王芸、李玉贤。



## 乳粉 滴定酸度的测定

代替 GB 5413—85

## Milk powder—Determination of titratable acidity

## 1 范围

本标准规定了测定乳粉的滴定酸度的基准方法和常规方法。  
本标准适用于乳粉滴定酸度的测定。

## 2 定义

本标准采用下列定义。

乳粉的酸度

用 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液滴定 100mL 干物质为 12% 的复原乳, 滴定至 pH 为 8.3 或溶液变为粉红色(酚酞指示剂)时, 所需 0.1mol/L 氢氧化钠溶液的毫升数。

## 方法一 基准法

## 3 方法原理

将一定量的乳粉溶于水中, 制成复原乳, 然后用 0.1mol/L 氢氧化钠滴定至 pH 为 8.3, 由此消耗的 0.1mol/L 氢氧化钠溶液毫升数可计算出滴定 100mL 干物质为 12% 的复原乳, 所需的氢氧化钠量。  
所需氢氧化钠溶液的量随产品中的自然缓冲物质变酸或添加酸性或碱性物质的量而变化。

## 4 试剂

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。

4.1 氢氧化钠标准溶液:  $c(\text{OH}^-)$  为  $0.1 \pm 0.0002 \text{mol/L}$ 。保护此溶液, 防止二氧化碳渗透。

氢氧化钠标准溶液的标定: 称取约 0.18g 于  $105 \sim 110^\circ\text{C}$  烘至恒重的邻苯二甲酸氢钾, 准确至 0.1mg, 用 50mL 无二氧化碳的水溶于锥形瓶中, 加两滴 5g/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。氢氧化钠标准溶液的浓度为:

$$c(\text{NaOH}) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.2042} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $c(\text{NaOH})$ ——氢氧化钠的浓度, mol/L;

$m$ ——称取的邻苯二甲酸氢钾的质量, g;

$V_1$ ——氢氧化钠溶液的用量, mL;

$V_2$ ——空白试验氢氧化钠溶液的用量, mL。

4.2 酚酞溶液: 取 0.5g 酚酞溶于 75mL 体积分数为 95% 的乙醇中, 并加入 20mL 水, 然后再加入氢氧化钠溶液(4.1), 直至加入一滴立即变成粉红色, 再加入水定容至 100mL。

4.3 氮气。

## 5 仪器

常用实验室仪器及:

- 5.1 天平:灵敏度为 0.01g 或更高。
- 5.2 滴定管:分刻度为 0.1mL,可准确至 0.05mL。
- 5.3 pH 计:带玻璃电极和适当的参比电极,已用 pH6 和 pH9 的缓冲溶液校准。可读至 0.01pH 单位。
- 5.4 磁力搅拌器。
- 5.5 量筒:100mL。
- 5.6 锥形瓶:250mL,带磨口和磨口玻璃塞,颈部可容纳电极,一个滴定管头和一根氮气管。

## 6 操作步骤

### 6.1 样品的制备

将样品全部移入到约两倍于样品体积的洁净干燥容器中(带密封盖),立即盖紧容器,反复旋转振荡,使样品彻底混合。在此操作过程中,应尽量避免样品暴露在空气中,使吸收的水分减少到最少。

### 6.2 测定

6.2.1 称取 4g 样品(6.1)于锥形瓶(5.6)中。准确至 10mg。

6.2.2 用量筒(5.5)量取 96mL 约 20℃ 的水,使样品(6.2.1)复原,剧烈搅拌,然后静止 20min。

6.2.3 用滴定管(5.2)向锥形瓶中滴加氢氧化钠溶液(4.1),直到 pH 达到 8.3(用 pH 计测定),滴定过程中,始终用磁力搅拌器(5.4)进行搅拌,同时向锥形瓶中吹氮气,防止溶液吸收空气中的二氧化碳。整个滴定过程应在 1min 内完成。

记录所用氢氧化钠溶液的毫升数,精确至 0.05mL。

## 7 分析结果的表述

$$\text{样品的滴定酸度}(^{\circ}\text{T}) = \frac{c \times 10 \times V \times 12}{m \times (1 - w)} \dots\dots\dots(2)$$

式中:  $c$ ——氢氧化钠标准溶液的浓度, mol/L;

$V$ ——滴定时所用 NaOH 溶液的毫升数(6.2.3), mL;

$m$ ——称取样品的质量, g;

$w$ ——样品中水分的质量分数, %;

12——12g 乳粉相当 100mL 复原乳(脱脂乳粉应为 9, 脱脂乳清粉应为 7)。

结果保留至小数点后一位。

注: 若以乳酸含量表示样品的酸度, 那么: 样品的乳酸含量(g/100g) =  $T \times 0.009$ 。  $T$  为样品的滴定酸度( $^{\circ}\text{T}$ ); 0.009 为乳酸的换算系数, 即 1mL 0.1mol/L 的氢氧化钠标准溶液相当于 0.009g 乳酸。

## 8 允许差

本方法的重复性为由同一分析人员, 同时或在短时间间隔内, 对同一样品所做的两次单独试验的结果之差不得超过 1.0 $^{\circ}\text{T}$ 。

### 方法二 常规法

## 9 方法原理

将一定量的乳粉溶解于水中, 制成复原乳。以酚酞作指示剂, 硫酸钴作参比颜色, 用 0.1mol/L 的氢氧化钠标准溶液滴定至粉红色, 根据所消耗的毫升数可计算出滴定 100mL 干物质为 12% 的复原乳, 所



需的氢氧化钠量。

所需氢氧化钠溶液的量随产品中的自然缓冲物质变酸或添加酸性或碱性物质的量而变化。

## 10 试剂

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。

10.1 氢氧化钠标准溶液: $c(\text{OH}^-)$ 为  $0.1 \pm 0.0002 \text{mol/L}$ 。标定同 4.1。

10.2 参比溶液:将 3g 七水硫酸钴( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )溶解于水中,并定容至 100mL。

10.3 酚酞溶液:同 4.2。

## 11 仪器

常用实验室仪器及:

11.1 分析天平。

11.2 滴定管:分刻度为 0.1mL,可准确至 0.05mL。

11.3 移液管:2mL。

11.4 量筒:100mL。

11.5 锥形瓶:250mL,带磨口和磨口玻璃塞。

## 12 操作步骤

### 12.1 样品的制备

将样品全部移入两倍于样品体积的洁净干燥容器中(带密封盖),立即盖紧容器,反复旋转振荡,使样品彻底混合。在此操作过程中,应尽量避免样品露置在空气中,使吸收的水分减少到最少。

### 12.2 样品的称取

称取 4g 样品(12.1)于锥形瓶(11.5)中,准确至 10mg。

### 12.3 测定

12.3.1 用量筒(11.4)量取 96mL 约 20℃的水,剧烈搅拌使样品(12.2)复原,然后静止 20min。

12.3.2 向其中的一只锥形瓶中加入 2~3mL 参比溶液(10.2),得到标准颜色,轻轻转动,使之混合。

如果要测定一系列相似的产品,则此标准溶液可用于整个测定过程,但不得超过 2h。

12.3.3 向第二只锥形瓶中加入 2mL 酚酞溶液(10.3),轻轻转动,使之混合。

12.3.4 用滴定管(11.2)向第二只锥形瓶中滴加氢氧化钠溶液(10.1),边滴加,边转动烧瓶,直到颜色与标准溶液的颜色相似,且 5s 内不消退。整个滴定过程应在 45s 内完成。

记录所用氢氧化钠溶液的毫升数,精确至 0.05mL。

## 13 分析结果的表述

$$\text{样品的滴定酸度}(\text{°T}) = \frac{c \times 10 \times V \times 12}{m \times (1 - w)} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:  $c$ ——氢氧化钠标准溶液的浓度, mol/L;

$V$ ——滴定时所用氢氧化钠溶液的毫升数(12.3.4), mL;

$m$ ——称取的样品的质量, g;

$w$ ——样品中水分的质量分数, %;

12——12g 乳粉相当 100mL 复原乳(脱脂乳粉应为 9, 脱脂乳清粉为 7)。

结果保留至小数点后一位。

注: 若以乳酸含量表示样品的酸度,那么:样品的乳酸含量(g/100g)= $T \times 0.009$ 。T 为样品的滴定酸度(°T);0.009 为乳酸的换算系数,即 1mL 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液相当于 0.009g 乳酸。



#### 14 允许差

本方法的重复性为由同一分析人员,同时或在短时间间隔内,对同一样品所做的两次单独试验的结果之差不得超过  $1.0^{\circ}\text{T}$ 。

---



## 前 言

本标准给出了两种方法。方法一为不溶度指数法，等同采用国际乳品联合会标准 IDF 129A：1988《乳粉和乳粉制品——不溶度指数的测定》；方法二为溶解度法，对 GB 5413—85 中 A.2 方法的文本格式进行了修改。

本标准方法一为仲裁法。

本系列标准从实施之日起，代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位：国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位：卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人：王芸、黄敏、王心祥、王晓钰。

美析

MACY

MACY INST

光度计系列生产

www.macylab.com TEL:400-6

婴幼儿配方食品和乳粉  
溶解性的测定

GB/T 5413.29—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Determination of solubility

## 1 范围

本标准规定了不溶度指数和溶解度的测定方法。

本标准方法一适用于不含大豆成分的乳粉的不溶度指数的测定,方法二适用于婴幼儿配方食品和乳粉的溶解度的测定。

## 方法一 乳粉的不溶度指数的测定

## 2 定义

本标准采用下列定义。

不溶度指数 insolubility index

在本标准规定的条件下,将乳粉或乳粉制品复原,并进行离心,所得到沉淀物的体积的毫升数。

## 3 方法原理

将样品加入到 24℃ 的水中或 50℃ 的水中,然后用特殊的搅拌器使之复原,静止一段时间后(有规定),使一定体积的复原乳在刻度离心管中离心,去除上层液体,加入与复原温度相同的水,使沉淀物重新悬浮,再次离心后,记录所得沉淀物的体积。

注:喷雾干燥产品复原时使用温度为 24℃ 的水,部分滚筒干燥产品复原时使用温度为 50℃ 的水。

## 4 试剂

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。

硅酮消泡剂:硅酮乳液的质量分数为 30%。

按第 9 章所述步骤(不加样品),检验硅酮消泡剂的适用性。试验结束后,离心管底部可见硅酮液体不应大于 0.01mL。

## 5 仪器

常用实验室仪器及:

5.1 水浴:工作温度为 24.0℃±0.2℃和/或 50.0℃±0.2℃,可放置一个或几个搅拌杯(5.8)。

5.2 温度计:可测定温度为 24℃和/或 50℃,误差不超过±0.2℃。

注:由于复原温度是影响不溶度指数的重要因素,所以在 6.1 和 6.3(和 6.4.8)中所用温度计的准确度应符合规定。

5.3 表面光滑的勺,或干净且光滑的取样纸(尺寸为 140mm×140mm)。用来称样。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

- 5.4 天平,准确到 0.01g。
- 5.5 塑料量筒,容量为 100mL $\pm$ 0.5mL(20℃)。  
注:与玻璃量筒相比,塑料量筒热容较低,所以在量筒中加入水后,温度变化最小。
- 5.6 刷子,可刷去勺或称样纸(5.3)上的残留样品。
- 5.7 电动搅拌器,具有以下特性:
- 搅拌器轴上有 16 个叶片(不锈钢),形状和尺寸如图 1 所示。叶片平的一面位于下方,对于按顺时针方向旋转的搅拌器,叶片从右向左向上倾斜<sup>1)</sup>。
  - 叶片之间成 30°角,水平齿间距(叶轮的圆周)为 8.73mm(11/32 英寸),使用一段时间后这些尺寸可能会变化,因此应周期性检查和维护。
  - 当搅拌杯固定在搅拌器上后,搅拌器轴的高度(即从叶片最低处到杯底的距离)应为 10mm $\pm$ 2mm,也就是说杯的深度为 132mm,由杯的顶部到叶片最低处是 122mm $\pm$ 2mm,杯顶部到叶片最高处为 115mm $\pm$ 2mm。叶轮应位于杯中央。
  - 当向搅拌杯中加入 100mL 24℃的水[加入或未加入样品(6.2)]进行混合时,搅拌器接通后,叶轮的固定转速为 3600r/min $\pm$ 100r/min(在 5s 之内达到)。叶轮的旋转方向应为顺时针(由图可看出)。应使用电动测速仪定期检查,在负载情况下叶轮的转速(如上所述),这对旧型的搅拌器尤其重要。对于非同步电动机,转速可以用调速器或速度指示器调整到 3600r/min $\pm$ 100r/min(适用于转速的准确度得不到保证的搅拌器)。
- 5.8 玻璃搅拌杯,容量为 500mL。可与搅拌器(5.7)配套使用。搅拌杯(四叶型),形状如图 1 所示,尺寸大致如图。
- 5.9 计时器;可显示 0~60s 和 0~60min。
- 5.10 平勺,长度约 210mm。
- 5.11 电动离心机;有速度显示器,垂直负载,有适合于离心管(5.12)并可向外转动的套管,管底加速度为 160g<sub>r</sub>,并且在离心机盖合时,温度保持在 20~25℃。  
注:在离心过程中产生的加速度等于  $1.12\pi^2 \times 10^4 r^2$ ,  $r$  为水平旋转的有效半径,mm; $\omega$  为转速,r/min。
- 5.12 玻璃离心管,锥形,尺寸、刻度、标注、无光泽处的斑纹等如图 2 所示,带橡胶塞。刻度数和标注“mL(20℃)”应持久不退,刻度线应清晰干净。20℃时,其容量最大误差如下:
- 在 0.1mL 处; $\pm$ 0.05mL;
  - 0.1~1mL; $\pm$ 0.1mL;
  - 1~2mL; $\pm$ 0.2mL;
  - 2~5mL; $\pm$ 0.3mL;
  - 5~10mL; $\pm$ 0.5mL;
  - 在 10mL 处; $\pm$ 1mL。
- 注:作为日常生产控制,可以使用其他形状的离心管,但容量误差必须符合上面所列出的要求。如果有争议的或需要确定的结果,则应使用 5.12 中规定的离心管。
- 5.13 虹吸管或与水泵相连的吸管,可除去离心管(5.12)中的上层液体,管由玻璃制成,并且带朝上的 U 型管,适于虹吸(见图 2)。
- 5.14 玻璃搅拌棒,长 250mm,直径为 3.5mm。
- 5.15 放大镜;读取沉淀物体积数。

1) 有些搅拌器,其叶轮可能是逆时针旋转的(见 a))。这些搅拌器的叶片要从左向右朝上倾斜,因此搅拌杯中液体运动方向产生的效果就与顺时针转动的叶轮一样。在其他方面,如轴的固定方式及与杯底部的距离,逆时针旋转叶轮与顺时针旋转叶轮的要求相同。



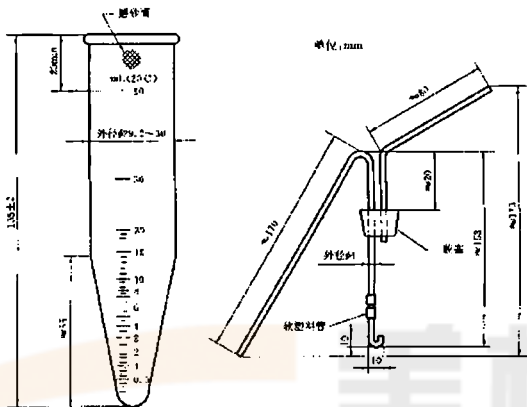


图2 离心管和相配的虹吸管

## 6 操作步骤

### 6.1 样品的制备

测定前,应保证实验室样品至少在室温(20~25℃)下保持48h,以使影响不溶度指数的因素,在各个样品中趋于一致。

然后反复振荡和反转样品容器,混合实验室样品。如果容器太满,则将全部样品移入清洁、干燥、密闭、不透明的大容器中,如上所述彻底混合。

对于速溶乳粉,应小心地混合,以防样品颗粒减小。

### 6.2 搅拌杯的准备

根据不溶度指数的测定温度(24℃或50℃),分别将搅拌杯(5.8)的温度调整到 $24.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 或 $50.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。方法是将搅拌杯放入水浴(5.1)中一段时间,水位接近杯顶。

注:后文中,“在 $24.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 或 $50.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 是适当的”是指采用这一温度。

### 6.3 样品部分

用勺(5.3)或在称样纸(5.3)上称样,精确至0.01g,取样量如下:

a) 全脂乳粉、部分脱脂乳粉、全脂加糖乳粉、乳基婴儿食品及其他以全脂乳粉和部分脱脂乳粉为原料生产的乳粉类产品:13.00g;

b) 脱脂乳粉和酪乳粉:10.00g;

c) 乳清粉:7.00g。

### 6.4 测定

6.4.1 从水浴中取出搅拌杯(见6.2),迅速擦干杯外部的的水,用量筒(5.5)向杯中加入100mL ± 0.5mL、 $24^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 或 $50.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 的水(见6.2注)。

6.4.2 向搅拌杯中加入3滴硅酮消泡剂(4.1),然后加入样品(6.3),必要时,可使用刷子(5.6),以使全部样品均落入水表面。

6.4.3 将搅拌杯放到搅拌器(5.7)上固定好,接通搅拌器开关,混合90s后,断开开关。如果搅拌器为非

同步电动机,带有调速器或速度指示器,则将叶轮在最初5s内的转速调到3600r/min±100r/min,并符合90s。

6.4.4 从搅拌器上取下搅拌杯(停留几秒,使叶片上的液体流入杯中),将杯在室温下(见9.2)静止5min以上,但不超过15min(见9.3)。

6.4.5 向杯内的混合物(见9.5)加入3滴硅酮消泡剂,用平勺(5.10)彻底混合杯中内容物10s(不要过度),然后立即将混合物倒入离心管(5.12)中至50mL刻度处,即顶部液位与50mL刻度线相吻合。

6.4.6 将离心管放入离心机中(要对称放置),使离心机迅速旋转,并在管底部产生160g<sub>a</sub>的加速度,然后在20~25℃下使之旋转5min。

6.4.7 取出离心管,用平勺(5.10)去除和倾倒在管上层脂肪类物质。竖直握住离心管,用虹吸管或吸管(5.13)去除上层液体,若为滚筒干燥产品,则吸到顶部液位与15mL刻度处重合,若为喷雾干燥乳粉,则与10mL刻度处重合,注意不要搅动不溶物。如果沉淀物体积明显超过15mL或10mL,则不再进行下部操作,记录不溶度指数为“15mL”或“>10mL”,并如第7章所述标明复原温度。反之应按6.4.8所述操作。

6.4.8 向离心管中加入24℃或50℃的水(见6.2注),直到液位与30mL刻度重合,用搅拌棒(5.14)充分搅拌沉淀物,将搅拌棒抵靠管壁,加入相同温度的水,将搅拌棒上的液体冲下,直到液位与50mL刻度处重合。

6.4.9 用橡胶塞塞上离心管,缓慢翻转离心管5次,彻底混合内容物,打开塞子(将塞底部靠在离心管边缘,以收集附着在上面的液体),然后如6.4.6所述,在规定的转速和温度下离心5min。

注:建议将离心管放入离心机中时,使离心管的刻度线在离心机旋转时既不朝上也不朝下,而是处于中间位置。这样即使沉淀物顶部倾斜,沉淀物体积也很容易估算。

6.4.10 取出离心管,竖直握住离心管,以适当背景为对照<sup>1)</sup>,使眼睛与沉淀物顶部平齐,借助放大镜(5.15)读取沉淀物体积数。如果沉淀物体积小于0.5mL,则精确至0.05mL。如果沉淀物体积大于0.5mL,则精确至0.1mL。如果沉淀物顶部倾斜,则估算其体积数。如果沉淀物顶部不齐,则使离心管垂直放置几分钟。通常沉淀物的顶部会变平些,因此比较容易读数。记录复原水温度。

## 7 分析结果的表述

样品的不溶度指数等于6.4.10中所记录的沉淀物体积的毫升数。并报告复原时所用水的温度。例如:

- 0.1mL(24℃)
- 4.1mL(50℃)

## 8 允许差

### 8.1 重复性

由同一分析人员,用相同仪器,在短时间间隔内,对同一样品所做的两次单独试验的结果之差不得超过0.138M, M是两次测定结果的平均值。

### 8.2 重现性

由不同实验室的两个分析人员,对同一样品所做的两次单独试验结果之差不得超过0.328M, M为两次测定结果的平均值。

1) 以灯光或暗背景为对照观察离心管,沉淀物的顶部会更醒目、易读。

## 9 注意事项

- 9.1 实验一旦开始,就应连续进行。任何步骤都不得间断。必须严格遵守所有关于时间和温度的规定。
- 9.2 由于不溶度指数的测定可能受环境温度的影响,所以建议检验过程应在温度为 20~25℃ 的实验室内进行。
- 9.3 该检验中允许有 5~15min 的放置时间(6.4.4),这点已表明对不溶度指数无明显影响。在 10min 之内如果事先将几个搅拌杯的温度都已调好(见 6.2),且将样品(6.3)同时称好,则可将这几个样品作为一批同时测定。这样,可以发现修正后的 6.2 和 6.4.1 操作步骤有一定的优越性,即向放在水浴中的搅拌杯内加入 100mL  $\pm$  0.5mL 水(温度适当)。当杯内水温稳定在正确值后,由水浴中取出一个搅拌杯,然后再按 6.4.1~6.4.4 步骤操作,同样,依次准备其他搅拌杯,这样则可同时离心成批样品。
- 9.4 各试样量等于:混合时,100mL 水中样品的总固体含量(用混合物的质量分数表示)大约为原始液体中的总固体含量。
- 9.5 在 6.4.5 中加入 3 滴硅酮消泡剂(4.1),对在混合过程中不大可能起泡的产品则是不必要的,但是为了使所有样品的操作步骤一致,应均加入 3 滴消泡剂。

## 方法二 溶解度的测定

## 10 定义

溶解度 solubility

每百克样品经规定的溶解过程后,全部溶解的质量。

## 11 仪器

常用实验室仪器及:

- 11.1 离心管;50mL,厚壁、硬质(见图 3)。
- 11.2 烧杯;50mL。
- 11.3 离心机。
- 11.4 称量皿;直径 50~70mm 的铝皿或玻璃皿。

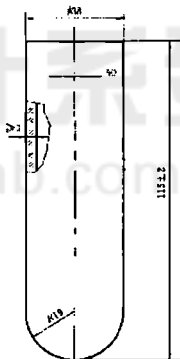


图 3 溶解度重量法离心管



## 12 操作步骤

- 12.1 称取样品 5g(准确至 0.01g)于 50mL 烧杯中,用 38mL 25~30℃ 的水分数次将乳粉溶解于 50mL 离心管中,加塞。
- 12.2 将离心管置于 30℃ 水中保温 5min,取出,振摇 3min。
- 12.3 置离心机中,以适当的转速离心 10min,使不溶物沉淀。倾去上清液,并用棉栓擦净管壁。
- 12.4 再加入 25~30℃ 的水 38mL,加塞,上、下摇动,使沉淀悬浮。
- 12.5 再置离心机中离心 10min,倾去上清液,用棉栓仔细擦净管壁。
- 12.6 用少量水将沉淀冲洗入已知质量的称量皿中,先在沸水浴上将皿中水分蒸干,再移入 100℃ 烘箱中干燥至恒重(最后两次质量差不超过 2mg)。

## 13 分析结果的表述

$$\text{样品中溶解度(g/100g)} = 100 - \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{(1 - B) \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:  $m$ ——样品的质量, g;

$m_1$ ——称量皿质量, g;

$m_2$ ——称量皿和不溶物干燥后质量, g;

$B$ ——样品水分, g/100g。

注: 加糖乳粉计算时要扣除加糖量。

## 14 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 2%。

## 前 言

本标准对 GB 5413—85 中 2.7 条方法的文本格式进行了修改,内容未做改动。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、张玉洁、黄敏、王晓钰、王心祥。



乳与乳粉 杂质度的测定

代替 GB 5413—85

Milk and milk powder—Determination of impurities

1 范围

本标准规定了杂质度的测定方法。

本标准适用于生鲜牛乳、巴氏杀菌乳、脱脂乳等液体加工乳,及不含非乳蛋白质,不含淀粉类成分的乳粉的杂质度的测定。

2 定义

本标准采用下列定义。

杂质度 **impurities**

根据本方法测得的 500mL 液体乳样品或 62.5g 乳粉样品中,不溶于约 60℃热水残留于过滤板上的可见带色杂质的数量。

3 仪器及设备

常用实验室仪器及:

3.1 过滤设备:正压或负压杂质度过滤机或 2000~2500mL 抽滤瓶(配有可安放棉质过滤板的瓷质过滤漏斗或特制漏斗)。

3.2 棉质过滤板:直径 32mm,密度为 135g/m<sup>3</sup>,符合附录 A(标准的附录)的要求,过滤时牛乳通过面积的直径为 28.6mm。

3.3 杂质度标准板。

杂质度标准板的制作方法见附录 B(标准的附录)。

3.4 烧杯:500mL。

4 操作步骤

4.1 取液体乳样 500mL,加热至 60℃(乳粉样取 62.5g,用已过滤的水充分调和,加热至 60℃或直接用 60℃水充分调合)。于过滤装置上的棉质过滤板上过滤,用水冲洗附于过滤板上的牛乳。将过滤板置于烘箱中烘干后,在非直接但均匀的光亮处与杂质度标准板比较,即可得出过滤板上的杂质量。

当过滤板上杂质的含量介于两个级别之间时,判定为杂质含量较多的级别。

5 分析结果的表述

前述与杂质度标准板比较得出的过滤板上的杂质量,即为该样品的杂质度。

6 允许差

按本标准所述方法对同一样品所作的两次重复测定,其结果应一致,否则应重复再测定两次。

附录 A  
(标准的附录)  
杂质度过滤板的检验

## A1 材料

**A1.1 润湿剂:**1%溶液。使用一种湿雾剂或其他合适的润湿剂。

**A1.2 植物胶溶液:**将 0.75g 角豆胶或其他合适的胶加到 100mL 水中,然后用搅拌器搅拌。

通过抽真空或加热处理,使溶液排除气泡。煮沸、冷却,然后加 2mL 40%甲醛溶液(这可以导致不溶解的植物碎片分离,使得使用的上清液清晰)。

为了便于在没有搅拌的情况下在水中分离,可将 0.75g 角豆胶溶于 100mL 容量瓶内的几毫升乙醇中。用水稀释至刻度,充分混合。然后按上述步骤继续操作。

**A1.3 蔗糖溶液:**将 750g 蔗糖溶于 750mL 水中。

**A1.4 精制杂质混合物:**0.2g/L 分散相。用地面牛粪、泥土及木炭经过干燥箱(100℃)烘干,制备混合物,每种材料分别过筛,收集可以通过 106 $\mu$ m 的[直径为 203.2mm(8in)],通不过 75 $\mu$ m 的筛子成分,做法如下:

放不要超过 100g 的牛粪或泥土,不要超过 50g 的木炭,过筛。在 106 $\mu$ m 的筛子外套装 75 $\mu$ m 的另一个筛子,覆盖、固定接收装置。用手振荡筛子的套,以每分钟敲打 120 次的速度过筛。一次操作大约用量 20g,以过 106 $\mu$ m 筛子的碎片继续在 75 $\mu$ m 的筛子上过 5min。使用第二次过筛所保留的成分,按下列比例最大程度的混合均匀:

牛粪	66%
泥土	28%
木炭	6%

将 2g 上述混合物放入到 100mL 单刻度标记的容量瓶中,用 5mL 润湿剂(A1.1)润湿。加入 46mL 植物胶溶液,然后用蔗糖溶液(A1.3)将液面加到瓶颈口。加几滴乙醇,再用蔗糖溶液加至刻度,充分混合。

将溶液倒入一个 250mL 烧杯或有螺旋盖的瓶子中,允许带进少量空气,用一个小的机械搅拌器以 200~300r/min 的速度搅拌,直到杂质在明亮的反射光下均匀地分布为止。固定搅拌器的叶片,以使细小颗粒不要堆积在烧杯底部的旋涡处。搅拌时,用单刻度吸管(出口直径 3mm)移取 10mL(大约相当于 200mg 杂质混合物)于容量瓶中,用水定容到 1000mL。

## A2 设备

**A2.1 天平:**精确到 0.0001g。

**A2.2 干燥器:**含有效干燥剂。

**A2.3 干燥箱:**可控制温度 100℃。

**A2.4 过滤装置(见 6.6)。**

**A2.5 过滤板(见 6.5)。**

**A2.6 滤纸:**直径 7cm 或 9cm,优质。

## A3 步骤

**A3.1** 将滤纸(A2.6)放在一个布氏漏斗中,用大约 200mL 的水冲洗,然后放入 100℃烘箱中烘干至恒重,转入带盖的干燥器内,称重。

**A3.2** 将 60mL 精制的杂质混合物(A1.4)经过充分搅拌后,通过安装在过滤装置上的过滤板(A2.5)过滤,这相当于 12mg 杂质。

用一个清洁的三角瓶收集滤液。将滤纸转移到烧杯中,用水冲洗该烧瓶二次,将洗液全部加入到烧杯中。

**A3.3** 将滤液再一次通过固定在布氏漏斗中的经清洗、干燥,并称好质量的滤纸(A3.1)。用水充分冲洗烧杯和滤纸,然后将滤纸放入 100℃烘箱中烘干至恒重(A3.1)。

**A3.4** 至少检验两个以上过滤板。

#### A4 评价

通过三个或三个以上过滤板中每个过滤板上杂质的平均量不超过 2.8mg。根据精制的杂质混合物制备的一个标准板不应在表层下面出现杂质。

### 附录 B

(标准的附录)

#### 杂质度标准板的制作

##### B1 材料

使焦粉、灰土、牛粪、木炭通过一定的筛子,然后在 100℃烘箱中烘干,并按下列比例配合混匀。

焦粉占 40%,其中:

通过 20 目筛而不通过 40 目筛的占 10%;

通过 40 目筛而不通过 60 目筛的占 30%。

灰土占 30%,

可通过 40 目筛。

牛粪占 20%,其中:

通过 20 目筛而不通过 40 目筛的占 2%;

通过 40 目筛而不通过 60 目筛的占 8%;

通过 60 目筛而不通过 80 目筛的占 10%。

木炭占 10%,其中:

通过 20 目筛而不通过 40 目筛的占 4%;

通过 40 目筛而不通过 60 目筛的占 6%。

##### B2 步骤

**B2.1** 将已准备好的各种杂质混匀(总量以 50g 为宜),从中准确称取 1.000g,直接倒入 500mL 容量瓶中,加蒸馏水 2mL 和体积分数为 0.75%经过过滤的阿拉伯胶液 23mL,再以质量分数为 50%的经过过滤的蔗糖液加至刻度并混匀,此液杂质浓度为 2mg/mL。

**B2.2** 取浓度为 2mg/mL 的杂质液 10mL,以 500g/L 过滤的蔗糖液稀释至 100mL,则此液杂质的浓度为 0.2mg/mL。

**B2.3** 取浓度为 0.2mg/mL 的杂质液 10mL,以 500g/L 过滤的蔗糖液稀释至 100mL,则此液杂质的浓度为 0.02mg/mL。

**B2.4** 以 500mL 牛乳或 62.5g 乳粉为取样量,按表 B1 制备各标准杂质板。

表 B1

标准板号	杂质相对质量浓度, mol/L		杂质绝对含量 mg	量取混合杂质液数量 mL
	500mL 牛乳	62.5g 乳粉		
1	0.25	2	0.125	6.25(0.02mg/mL)
2	0.75	6	0.375	18.75(0.02mg/mL)
3	1.50	12	0.750	3.75(0.2 mg/mL)
4	2.0	16	1.000	5.00(0.2 mg/mL)


**美析仪器**  
 MACY INSTRUMENT  
 专业光度计系列生产厂家  
 HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

## 前 言

本标准给出的是尿酶的定性测定方法,方法快速准确。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:王芸、殷晓红、房玉国、王克新。



# 婴幼儿配方食品和乳粉 脲酶的定性检验

GB/T 5413.31—1997

代替 GB 5413—85

Milk powder and formula foods for infant and young children  
—Qualitative detection of urease

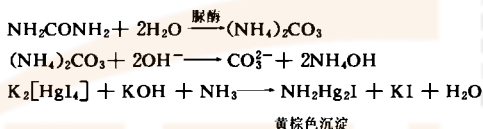
## 1 范围

本标准规定了脲酶的定性检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中脲酶的定性检验。

## 2 方法原理

脲酶在适当酸碱度和温度下,催化尿素转化成碳酸铵。而碳酸铵在碱性条件下形成氢氧化铵,与钠氏试剂中的碘化钾汞盐作用形成棕色的碘化双汞铵。



## 3 试剂

3.1 尿素溶液:10g/L。

3.2 钨酸钠溶液:100g/L。

3.3 酒石酸钾钠溶液:20g/L。

3.4 硫酸:体积分数5%。

3.5 中性缓冲液

取下述磷酸氢二钠溶液 611mL,磷酸二氢钾溶液 389mL,两种溶液混合均匀。

3.5.1 磷酸氢二钠溶液

称取无水磷酸氢二钠 9.47g,溶于 1000mL 蒸馏水中。

3.5.2 磷酸二氢钾溶液

称取磷酸二氢钾 9.07g,溶于 1000mL 蒸馏水中。

3.6 钠氏试剂

称取红色碘化汞( $\text{HgI}_2$ )55g,碘化钾 41.25g,溶于 250mL 蒸馏水中,溶解后,倒入 1000mL 容量瓶中。再称取氢氧化钠 144g 溶于 500mL 水中,溶解并冷却后,再缓慢地倒入上述 1000mL 的容量瓶中,加水至刻度,摇匀,倒入试剂瓶静置后,用上清液。

## 4 操作步骤

4.1 取 10mL 比色管甲、乙两支,各加入 0.1g 样品,1mL 蒸馏水。振摇 0.5min(约 100 次)。然后各加  
国家技术监督局 1997-05-28 批准 1998-09-01 实施



入 1mL 中性缓冲溶液(3.5)。

4.2 向甲管(样品管)加入 1mL 尿素溶液(3.1)。再向乙管(空白对照管)加入 1mL 蒸馏水,两管摇匀后,置于 40℃水浴中保温 20min。

4.3 从水浴中取出两管后,各加 4mL 蒸馏水,摇匀,再加 1mL 钨酸钠溶液(3.2),摇匀,加 1mL 硫酸溶液(3.4),摇匀,过滤备用。

4.4 取上述滤液 2mL,分别注入二支 25mL 具塞的比色管中。各加入 15mL 水,1mL 酒石酸钾钠溶液(3.3),2mL 钠氏试剂(3.6),最后以蒸馏水定容至 25mL,摇匀。观察结果。

## 5 分析结果的表述

分析结果按表 1 进行判断。

表 1 结果的判断

脲酶定性	表示符号	显示情况
强阳性	++++	砖红色混浊或澄清液
次强阳性	+++	桔红色澄清液
阳性	++	深金黄色或黄色澄清液
弱阳性	+	淡黄色或微黄色澄清液
阴性	—	样品管与空白对照管同色或更淡

## 前 言

乳粉中含有的硝酸盐、亚硝酸盐主要来源于原料乳中的人为掺假和牛饲料,对其含量的测定国际上广泛采用镉还原和光度分析法。本标准等同采用国际乳品联合会标准 **IDF95A:1984**《乳粉——硝酸盐和亚硝酸盐含量的测定(镉还原和分光光度法)》中的镉柱再生部分稍做修改。其他内容均相同。

本系列标准从实施之日起,代替 **GB 5413—85**。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:黄敏、田间、刘波、王芸、王心祥。



## 乳粉 硝酸盐、亚硝酸盐的测定

代替 GB 5413—85

## Milk powder—Determination of nitrate and nitrite contents

## 1 范围

本标准规定了采用镉还原和光度分析法测定硝酸盐和亚硝酸盐的方法。

本标准适用于乳粉中硝酸盐和亚硝酸盐的测定。

本方法检出极限分别为：硝酸盐 1.5mg/kg；亚硝酸盐 0.2mg/kg。

## 2 方法原理

将乳粉样品溶解于水中，沉淀脂肪和蛋白后，进行过滤。用镀铜镉粒使部分滤液中的硝酸盐还原为亚硝酸盐。在未还原的滤液和已还原的滤液中，加入磺胺和 N-1-萘基-乙二胺二盐酸盐，使其显粉红色，然后用分光光度计在 538nm 波长下测其吸光度。

将测得的吸光度与亚硝酸钠标准系列溶液的吸光度进行比较，就可计算出样品中的亚硝酸盐含量和硝酸盐还原后的亚硝酸盐总量；从两者之间的差值可以计算出硝酸盐的含量。

## 3 试剂

测定用水应是不含硝酸盐和亚硝酸盐的蒸馏水或去离子水。

注：为避免镀铜镉柱(4.10)中混入小气泡，柱制备(5.1)、柱还原能力的检查(5.2)和柱的再生(5.3)时所用的蒸馏水或去离子水，最好是刚煮沸过并冷却至室温的。

### 3.1 镀铜镉粒：直径 0.3~0.8mm。也可按下述方法制备。

将适量的锌棒放入烧杯中，用 40g/L 的硫酸镉( $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ )溶液浸没锌棒。在 24h 之内，不断将锌棒上的海绵状镉刮下来。取出锌棒，滗出烧杯中多余的溶液，剩下的溶液能浸没镉即可。用蒸馏水冲洗海绵状镉 2~3 次，然后把镉移入小型搅拌器中，同时加入 400mL 0.1mol/L 的盐酸。搅拌几秒钟，以得到所需粒度的颗粒。将搅拌器中的镉粒连同溶液一起倒回烧杯中，静止几小时，这期间要搅拌几次以除掉气泡。倾出大部分溶液，立即按 5.1.1 至 5.1.8 中叙述的方法镀铜。

### 3.2 硫酸铜溶液：溶解 20g 五水硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )于水中，稀释至 1000mL。

3.3 盐酸-氨水缓冲溶液：pH9.6~9.7。用 600mL 水稀释 75mL 浓盐酸( $\rho_{20} 1.19\text{g/mL}$ ，质量分数约为 38%)。混匀后，再加入 135mL 浓氨水( $\rho_{20} 0.91\text{g/mL}$ ，质量分数等于 25%的新鲜氨水)。用水稀释至 1000mL，混匀。用精密 pH 计调 pH 值为 9.60~9.70。

3.4 盐酸溶液： $c(\text{H}^+)$ 约为 2mol/L。用水将 160mL 的浓盐酸( $\rho_{20} 1.19\text{g/mL}$ )稀释至 1000mL。

3.5 盐酸溶液： $c(\text{H}^+)$ 约为 0.1mol/L。将 50mL 2mol/L 的盐酸溶液用水稀释至 1000mL。

### 3.6 沉淀蛋白和脂肪的溶液：

3.6.1 硫酸锌溶液：将 53.5g 的七水硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )溶于水中，并稀释至 100mL。

3.6.2 亚铁氰化钾溶液：将 17.2g 的三水亚铁氰化钾( $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ )溶于水中，稀释至 100mL。

3.7 EDTA 溶液：用水将 33.5g 的二水乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )溶解，稀释至 1000mL。

国家技术监督局 1997-05-28 批准

1998-09-01 实施

3.8 显色液 1: 体积比 450 : 550 盐酸溶液。将 450mL 浓盐酸加入到 550mL 水中, 冷却后装入试剂瓶中。

3.9 显色液 2: 5g/L 的磺胺溶液。在 75mL 水中加入 5mL 浓盐酸, 然后在水浴上加热, 用其溶解 0.5g 磺胺( $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ )。冷却至室温后用水稀释至 100mL。必要时进行过滤。

3.10 显色液 3: 1g/L 的萘胺盐酸盐溶液。将 0.1g 的 N-1-萘基-乙二胺二盐酸盐( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ )溶于水, 稀释至 100mL。必要时过滤。

注: 此溶液应少量配制, 装于密封的棕色瓶中, 冰箱中 2~5℃ 保存。

3.11 亚硝酸钠标准溶液: 相当于亚硝酸盐的浓度为 0.001g/L。

将亚硝酸钠( $\text{NaNO}_2$ )在 110~120℃ 的范围内干燥至恒重。冷却后称取 0.150g, 溶于 1000mL 容量瓶中, 用水定容。在使用的当天配制该溶液。

于 1000mL 容量瓶中, 取 10mL 上述溶液和 20mL 缓冲溶液(3.3), 用水定容。

1mL 该标准溶液中含 1.00μg 的  $\text{NO}_2^-$ 。

3.12 硝酸钾标准溶液, 相当于硝酸盐的浓度为 0.0045g/L。

将硝酸钾( $\text{KNO}_3$ )在 110~120℃ 的温度范围内干燥至恒重, 冷却后称取 1.4680g, 溶于 1000mL 容量瓶中, 用水定容。

在使用当天, 于 1000mL 的容量瓶中, 取 5mL 上述溶液和 20mL 缓冲溶液(3.3), 用水定容。

1mL 的该标准溶液含有 4.50μg 的  $\text{NO}_3^-$ 。

#### 4 仪器

所有玻璃仪器都要用蒸馏水冲洗, 以保证不带有硝酸盐和亚硝酸盐。

4.1 分析天平。

4.2 烧杯: 100mL。

4.3 锥形瓶: 250mL, 500mL。

4.4 容量瓶: 100mL、500mL 和 1000mL。

4.5 移液管: 2mL、5mL、10mL、20mL。

4.6 吸量管: 2mL、5mL、10mL、25mL。

4.7 量筒: 根据需要选取。

4.8 玻璃漏斗: 直径约 9cm, 短颈。

4.9 定性滤纸: 直径约 18cm。

4.10 还原反应柱: 简称镉柱, 如图 1 所示。

4.11 分光光度计: 测定波长 538nm, 使用 1~2cm 光程的比色皿。

4.12 pH 计, 精度为 ±0.01, 使用前用 pH7 和 pH9 的标准溶液进行校正。

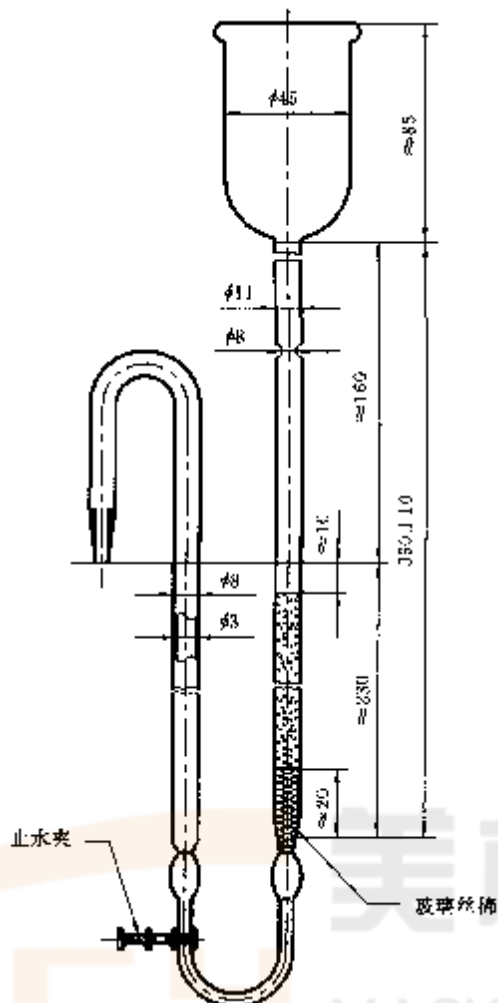


图1 硝酸盐还原装置

## 5 操作步骤

### 5.1 制备镀铜镉柱

5.1.1 置镉粒(3.1)于锥形烧瓶(4.3)中(所用镉粒的量以达到要求的镉柱高度为准)。

5.1.2 加足量的盐酸(3.4)以浸没镉粒,摇晃几分钟。

5.1.3 滗出溶液,在锥形烧瓶中用水反复冲洗,直到把氯化物全部冲洗掉。

5.1.4 在镉粒上镀铜。向镉粒中加入硫酸铜溶液(3.2)(每克镉粒约需 2.5mL),摇晃 1min。

5.1.5 滗出液体,立即用水冲洗镀铜镉粒,注意镉粒要始终用水浸没。当冲洗水中不再有铜沉淀时即可停止冲洗。

5.1.6 在用于盛装镀铜镉粒的玻璃柱的底部装上几厘米高的玻璃纤维(见图1)。在玻璃柱中灌入水,排净气泡。

5.1.7 将镀铜镉粒尽快地装入玻璃柱,使其暴露于空气的时间尽量短。镀铜镉粒的高度应在 15~20cm 的范围内。

注

1 避免在颗粒之间遗留空气。

2 注意不能让液面低于镀铜镉粒的顶部。

5.1.8 新制备柱的处理。以不大于 6mL/min 的流量将由 750mL 水、225mL 硝酸钾标准溶液(3.12)、20mL 缓冲溶液(3.3)和 20mL EDTA 溶液(3.7)组成的混合液通过刚装好镉粒的玻璃柱,接着用 50mL

水以同样流速冲洗该柱。

## 5.2 检查柱的还原能力

这种检查每天至少要进行两次,一般在开始时和一系列测定之后。

5.2.1 用移液管将 20mL 的硝酸钾标准溶液(3.12)移入还原柱顶部的贮液杯中,再立即向该贮液杯中添加 5mL 缓冲溶液(3.3)。用一个 100mL 的容量瓶收集洗提液。洗提液的流量不应超过 6mL/min。

5.2.2 在贮液杯将要排空时,用约 15mL 水冲洗杯壁。冲洗水流完后,再用 15mL 水重复冲洗。当第二次冲洗水也流完后,将贮液杯灌满水,并使其以最大流量流过柱子。

5.2.3 当容量瓶中的洗提液接近 100mL 时,从柱子下取出容量瓶,用水定容至刻度,混合均匀。

5.2.4 移取 10mL 洗提液于 100mL 容量瓶中,加水至 60mL 左右。然后按 5.8.2、5.8.3 和 5.8.4 操作。

5.2.5 根据测得的吸光度,从标准曲线(5.8.5)上可查得稀释洗提液(5.2.4)中的亚硝酸盐含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。据此可计算出以百分率表示的柱还原能力( $\text{NO}_2^-$  的含量为  $0.067\mu\text{g}/\text{mL}$  时还原能力为 100%)。如果还原能力小于 95%,柱子就需要再生。

## 5.3 柱子再生

柱子使用后,或镉柱的还原能力低于 95%时,按如下步骤进行再生。

5.3.1 在 100mL 水中加入约 5mL EDTA 溶液(3.7)和 2mL 盐酸溶液(3.5)。以 10mL/min 左右的速度过柱。

5.3.2 当贮液杯中混合液排空后,按顺序用 25mL 水、25mL 盐酸溶液(3.5)和 25mL 水冲洗柱子。

5.3.3 检查镉柱的还原能力,如低于 95%,要重复再生。

## 5.4 样品的称取和溶解

5.4.1 液体乳样品:量取 90mL 样品于 500mL 锥形瓶中,用 22mL 50~55℃的水分数次冲洗样品量筒,冲洗液倾入锥形瓶中,混匀。

5.4.2 乳粉样品:在 100mL 烧杯中称取 10g 样品,准确至 0.001g。用 112mL 50~55℃的水将样品洗入 500mL 锥形瓶中,混匀。

5.4.3 乳清粉及以乳清粉为原料生产的婴儿配方粉样品:在 100mL 烧杯中称取 10g 样品,准确至 0.001g。用 112mL 50~55℃的水将样品洗入 500mL 锥形瓶中,混匀。用铝箔纸盖好锥形瓶口,将溶好的样品在沸水中煮 15min,然后冷却至约 50℃。

## 5.5 脂肪和蛋白质的去除

5.5.1 按顺序加入 24mL 硫酸锌溶液(3.6.1)、24mL 亚铁氰化钾溶液(3.6.2)和 40mL 缓冲溶液(5.3),加入时要边加边摇,每加完一种溶液都要充分摇匀。

5.5.2 静止 15min~1h。然后用滤纸(4.9)过滤,滤液用 250mL 锥形瓶收集。

## 5.6 硝酸盐还原为亚硝酸盐

5.6.1 移取 20mL 滤液于 100mL 小烧杯中,加入 5mL 缓冲溶液(3.3),混匀,倒入镉柱顶部的贮液杯中,以小于 6mL/min 的流速过柱。洗提液(过柱后的液体)接入 100mL 容量瓶中。

5.6.2 当贮液杯快要排空时,用 15mL 水冲洗小烧杯,再倒入贮液杯中。冲洗水流完后,再用 15mL 水重复一次。当第二次冲洗水快流完时,将贮液杯装满水,以最大流速过柱。

5.6.3 当容量瓶中的洗提液接近 100mL 时,取出容量瓶,用水定容,混匀。

## 5.7 测定

5.7.1 分别移取 20mL 洗提液(5.6.3)和 20mL 滤液(5.5.2)于 100mL 容量瓶中,加水至约 60mL。

5.7.2 在每个容量瓶中先加入 6mL 显色液 1(3.8),边加边混;再加入 5mL 显色液 2(3.9)。小心混合溶液,使其在室温下静置 5min,避免直射阳光。

5.7.3 加入 2mL 显色液 3(3.10),小心混合,使其在室温下静置 5min,避免直射阳光。用水定容至刻度,混匀。



5.7.4 在 15min 内用 538nm 波长,以空白试验液体为对照测定上述样品溶液的吸光度。

## 5.8 标准曲线的制作

5.8.1 分别移取(或用滴定管放出)0,2,4,6,8,10,12,16 和 20mL 亚硝酸钠标准溶液(3.11)于九个 100mL 容量瓶中。在每个容量瓶中加入水,使其体积约为 60mL。

5.8.2 在每个容量瓶中先加入 6mL 显色液 1(3.8),边加边混;再加入 5mL 显色液 2(3.9)。小心混合溶液,使其在室温下静置 5min,避免直射阳光。

5.8.3 加入 2mL 显色液 3(3.10),小心混合,使其在室温下静置 5min,避免直射阳光。用水定容至刻度,混匀。

5.8.4 在 15min 内,用 538nm 波长,以第一个溶液(不含亚硝酸钠)为对照测定另外八个溶液的吸光度。

5.8.5 将测得的吸光度对亚硝酸根质量浓度作图。亚硝酸根的质量浓度可根据加入的亚硝酸钠标准溶液的量计算出。亚硝酸根的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标。亚硝酸根的质量浓度以  $\mu\text{g}/100\text{mL}$  表示。

## 6 分析结果的表述

### 6.1 亚硝酸盐含量

$$\text{样品中亚硝酸根含量}(\text{mg}/\text{kg}) = \frac{20\,000 \times c_1}{m \times V_1} \quad \dots\dots(1)$$

式中:  $c_1$ ——根据滤液(5.5.2)的吸光度(5.7.4),从标准曲线上读取的  $\text{NO}_2^-$  的浓度,  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ;

$m$ ——样品的质量(液体乳的样品质量为  $90 \times 1.030\text{g}$ ),g;

$V_1$ ——所取滤液(5.5.2)的体积(5.7.1),mL。

样品中以亚硝酸钠表示的亚硝酸盐含量

$$W(\text{NaNO}_2) = 1.5 \times W(\text{NO}_2^-) \quad \dots\dots(2)$$

式中:  $W(\text{NO}_2^-)$ ——样品中亚硝酸根的含量,mg/kg;

$W(\text{NaNO}_2)$ ——样品中以亚硝酸钠表示的亚硝酸盐的含量,mg/kg。

报告测定结果准确至 0.1mg/kg。

### 6.2 硝酸盐含量

$$\text{样品中硝酸根含量}(\text{mg}/\text{kg}) = 1.35 \times \left( \frac{100\,000 \times c_2}{m \times V_2} - W(\text{NO}_2^-) \right) \quad \dots\dots(3)$$

式中:  $c_2$ ——根据洗提液(5.6.3)的吸光度(5.7.4),从标准曲线上读取的亚硝酸根离子浓度,  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ;

$m$ ——样品的质量,g;

$V_2$ ——所取洗提液(5.6.3)的体积(5.7.1),mL;

$W(\text{NO}_2^-)$ ——根据式(1)计算出的亚硝酸根含量。

若考虑柱的还原能力,

$$\text{样品的硝酸根含量}(\text{mg}/\text{kg}) = 1.35 \times \left( \frac{100\,000 \times c_2}{m \times V_2} - W(\text{NO}_2^-) \right) \times \frac{100}{r} \quad \dots\dots(4)$$

式中:  $r$ ——测定一系列样品后柱的还原能力。

样品中以硝酸钠计的硝酸盐的含量

$$W(\text{NaNO}_3) = 1.371 \times W(\text{NO}_3^-) \quad \dots\dots(5)$$

式中:  $W(\text{NO}_3^-)$ ——样品中硝酸根的含量,mg/kg;

$W(\text{NaNO}_3)$ ——样品中以硝酸钠计的硝酸盐的含量,mg/kg。

报告检测结果准确至 0.1mg/kg。

## 7 允许差

### 7.1 重复性

7.1.1 由同一分析人员在短时间间隔内测定的两个亚硝酸盐结果之间的差值，不应超过  $1\text{mg/kg}$ 。

7.1.2 由同一分析人员在短时间间隔内测定的两个硝酸盐结果之间的差值，在硝酸盐含量小于  $30\text{mg/kg}$  时，不应超过  $3\text{mg/kg}$ ；在硝酸盐含量大于  $30\text{mg/kg}$  时，不应超过结果平均值的 10%。

### 7.2 重现性

由不同实验室的两个分析人员对同一样品测得的两个硝酸盐结果之差，在硝酸盐含量小于  $30\text{mg/kg}$  时，差值不应超过  $8\text{mg/kg}$ ；在硝酸盐含量大于或等于  $30\text{mg/kg}$  时，该差值不应超过结果平均值的 25%。

