食品伙伴网 www.foodMate.net

关注食品安全，探讨食品技术。

汇聚行业英才，推动行业发展。

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

乳品安全国家标准汇编

（已根据卫生部2010年5月26日勘误说明进行更新）

此标准汇编由食品伙伴网整理完成，欢迎下载。

本汇编根据卫生部通告附件整理而成，由pdf书签可以方便查看每个标准，共计66个乳品安全国家标准，合并后共计532页。

新的乳品安全国家标准包括乳品产品标准15项、生产规范2项、检验方法标准49项，基本解决现行乳品标准的矛盾、重复、交叉和指标设置不科学等问题，提高了乳品安全国家标准的科学性，形成统一的乳品安全国家标准体系。

卫生部通告：http://down.foodmate.net/info/sort/2/3390.html

乳品安全国家标准情况解读：http://down.foodmate.net/info/sort/1/3392.html

乳品安全国家标准2010年6月1日起陆续实施。

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，QQ:363986600.

乳品安全国家标准目录

GB19301-2010　生乳
GB19645-2010　巴氏杀菌乳
GB25190-2010　灭菌乳
GB25191-2010　调制乳
GB19302-2010　发酵乳
GB13102-2010　炼乳
GB19644-2010　乳粉
GB11674-2010　乳清粉和乳清蛋白粉
GB19646-2010　稀奶油、奶油和无水奶油
GB5420-2010　干酪
GB25192-2010　再制干酪
GB10765-2010　婴儿配方食品
GB10767-2010　较大婴儿和幼儿配方食品
GB10769-2010　婴幼儿谷类辅助食品
GB10770-2010　婴幼儿罐装辅助食品
GB12693-2010　乳制品良好生产规范
GB23790-2010　粉状婴幼儿配方食品良好生产规范
GB5413.33-2010　生乳相对密度的测定
GB5413.30-2010　乳和乳制品杂质度的测定
GB5413.34-2010　乳和乳制品酸度的测定
GB5413.3-2010　婴幼儿食品和乳品中脂肪的测定
GB5413.29-2010　婴幼儿食品和乳品溶解性的测定
GB5413.27-2010　婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定
GB5413.5-2010　婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定
GB5413.6-2010　婴幼儿食品和乳品中不溶性膳食纤维的测定
GB5413.9-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定
GB5413.10-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素K_1的测定
GB5413.11-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素B_1的测定
GB5413.12-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素B_2的测定
GB5413.13-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素B_6的测定
GB5413.14-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素B_{12}的测定
GB5413.15-2010　婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定
GB5413.16-2010　婴幼儿食品和乳品中叶酸(叶酸盐活性)的测定
GB5413.17-2010　婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定
GB5413.18-2010　婴幼儿食品和乳品中维生素C的测定
GB5413.19-2010　婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定
GB5413.21-2010　婴幼儿食品和乳品中钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰的测定
GB5413.22-2010　婴幼儿食品和乳品中磷的测定
GB5413.23-2010　婴幼儿食品和乳品中碘的测定
GB5413.24-2010　婴幼儿食品和乳品中氯的测定
GB5413.25-2010　婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定

GB5413.26-2010　婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定
GB5413.35-2010　婴幼儿食品和乳品中β-胡萝卜素的测定
GB5413.36-2010　婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定
GB5413.37-2010　乳和乳制品中黄曲霉毒素M_1的测定
GB5009.5-2010　食品中蛋白质的测定
GB5009.3-2010　食品中水分的测定
GB5009.4-2010　食品中灰分的测定
GB5009.12-2010　食品中铅的测定
GB5009.33-2010　食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定
GB5009.24-2010　食品中黄曲霉毒素M_1和B_1的测定
GB5009.93-2010　食品中硒的测定
GB21703-2010　乳和乳制品中苯甲酸和山梨酸的测定
GB22031-2010　干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐的测定
GB5413.38-2010　生乳冰点的测定
GB5413.39-2010　乳和乳制品中非脂乳固体的测定
GB4789.1-2010　食品微生物学检验　总则
GB4789.2-2010　食品微生物学检验　菌落总数测定
GB4789.3-2010　食品微生物学检验　大肠菌群计数
GB4789.4-2010　食品微生物学检验　沙门氏菌检验
GB4789.10-2010　食品微生物学检验　金黄色葡萄球菌检验
GB4789.15-2010　食品微生物学检验　霉菌和酵母计数
GB4789.18-2010　食品微生物学检验　乳与乳制品检验
GB4789.30-2010　食品微生物学检验　单核细胞增生李斯特氏菌检验
GB4789.35-2010　食品微生物学检验　乳酸菌检验
GB4789.40-2010　食品微生物学检验　阪崎肠杆菌检验

中华人民共和国国家标准

GB 19301—2010

食品安全国家标准

生 乳

National food safety standard

Raw milk

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB 19301-2003《鲜乳卫生标准》及第1号修改单。

本标准与GB 19301-2003相比，主要变化如下：

——标准名称改为《生乳》；

——增加了“术语和定义”；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——“农药残留限量”直接引用GB 2763及国家有关规定和公告；

——修改了“微生物指标”。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GBn 33-1977、GB 19301-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

生 乳

1 范围

本标准适用于生乳，不适用于即食生乳。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 生乳 raw milk

从符合国家有关要求的健康奶畜乳房中挤出的无任何成分改变的常乳。产犊后七天的初乳、应用抗生素期间和休药期间的乳汁、变质乳不应用作生乳。

4 技术要求

4.1 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.2 理化指标：应符合表 2 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2　理化指标

项　　目	指　　标	检验方法
冰点[a,b]/（℃）	－0.500～－0.560	GB 5413.38
相对密度/(20℃/4℃)　　≥	1.027	GB 5413.33
蛋白质/(g/100g)　　≥	2.8	GB 5009.5
脂肪/(g/100g)　　≥	3.1	GB 5413.3
杂质度/(mg/kg)　　≤	4.0	GB 5413.30
非脂乳固体/(g/100g)　　≥	8.1	GB 5413.39
酸度/(°T) 牛乳[b] 羊乳	 12～18 6～13	GB 5413.34
[a]挤出 3h 后检测。 [b]仅适用于荷斯坦奶牛。		

4.3　污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.4　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.5　微生物限量：应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项　　目	限量[CFU/g(mL)]	检验方法
菌落总数　　≤	2×10^6	GB 4789.2

4.6　农药残留限量和兽药残留限量

4.6.1　农药残留量应符合 GB 2763 及国家有关规定和公告。

4.6.2　兽药残留量应符合国家有关规定和公告。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 19302—2010

食品安全国家标准

发酵乳

National food safety standard

Fermented milk

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准 Codex Stan 243-2003（Revision 2008）Codex Standard for Fermented Milks，本标准与 Codex Stan 243-2003（Revision 2008）的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 19302-2003《酸乳卫生标准》和第 1 号修改单以及 GB 2746-1999《酸牛乳》中的部分指标，GB 2746-1999《酸牛乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与 GB 19302-2003 相比，主要变化如下：

——标准名称改为《发酵乳》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官指标”；

——取消了脱脂、部分脱脂产品的脂肪要求；

——取消了风味发酵乳产品中非脂乳固体指标；

——取消了总固形物要求；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用 GB 2761 的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——取消了致病菌中志贺氏菌的要求；

——修改了产品中乳酸菌数的要求；

——增加了对营养强化剂的要求。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19302-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

发酵乳

1 范围

本标准适用于全脂、脱脂和部分脱脂发酵乳。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 发酵乳 fermented milk

以生牛（羊）乳或乳粉为原料，经杀菌、发酵后制成的 pH 值降低的产品。

3.1.1 酸乳 yoghurt

以生牛（羊）乳或乳粉为原料，经杀菌、接种嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌（德氏乳杆菌保加利亚亚种）发酵制成的产品。

3.2 风味发酵乳 flavored fermented milk

以 80%以上生牛（羊）乳或乳粉为原料，添加其它原料，经杀菌、发酵后 pH 值降低，发酵前或后添加或不添加食品添加剂、营养强化剂、果蔬、谷物等制成的产品。

3.2.1 风味酸乳 flavored yoghurt

以 80%以上生牛（羊）乳或乳粉为原料，添加其它原料，经杀菌、接种嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌（德氏乳杆菌保加利亚亚种）发酵前或后添加或不添加食品添加剂、营养强化剂、果蔬、谷物等制成的产品。

4 指标要求

4.1 原料要求

4.1.1 生乳：应符合 GB 19301 规定。

4.1.2 其它原料：应符合相应安全标准和/或有关规定。

4.1.3 发酵菌种：保加利亚乳杆菌（德氏乳杆菌保加利亚亚种）、嗜热链球菌或其它由国务院卫生行政部门批准使用的菌种。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　感官要求

项　目	要　求		检验方法
	发酵乳	风味发酵乳	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
色泽	色泽均匀一致，呈乳白色或微黄色。	具有与添加成分相符的色泽。	
滋味、气味	具有发酵乳特有的滋味、气味。	具有与添加成分相符的滋味和气味。	
组织状态	组织细腻、均匀，允许有少量乳清析出；风味发酵乳具有添加成分特有的组织状态。		

4.3　理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2　理化指标

项　目	指　标		检验方法
	发酵乳	风味发酵乳	
脂肪[a]/(g/100g)　≥	3.1	2.5	GB 5413.3
非脂乳固体/(g/100g)　≥	8.1	—	GB 5413.39
蛋白质/(g/100g)　≥	2.9	2.3	GB 5009.5
酸度/(°T)　≥	70.0		GB 5413.34
[a] 仅适用于全脂产品。			

4.4 污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.5 真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6 微生物限量：应符合表 3 的规定。

表 3　微生物限量

项　目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
大肠菌群	5	2	1	5	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	0	0 /25 g(mL)	–	GB 4789.10 定性检验
沙门氏菌	5	0	0 /25 g(mL)	–	GB 4789.4
酵母　≤	100				GB 4789.15
霉菌　≤	30				
[a] 样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。					

4.7　乳酸菌数：应符合表 4 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 4　乳酸菌数

项　目	限量[CFU/g(mL)]	检验方法
乳酸菌数[a]　≥	1×10^6	GB 4789.35
[a]发酵后经热处理的产品对乳酸菌数不作要求。		

4.8　食品添加剂和营养强化剂

4.8.1　食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.8.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760 和 GB 14880 的规定。

5 其他

5.1　发酵后经热处理的产品应标识“××热处理发酵乳”、“××热处理风味发酵乳”、“××热处理酸乳/奶”或“××热处理风味酸乳/奶”。

5.2　全部用乳粉生产的产品应在产品名称紧邻部位标明“复原乳”或“复原奶”；在生牛（羊）乳中添加部分乳粉生产的产品应在产品名称紧邻部位标明“含××%复原乳”或“含××%复原奶”。

注：“××%”是指所添加乳粉占产品中全乳固体的质量分数。

5.3　“复原乳”或“复原奶”与产品名称应标识在包装容器的同一主要展示版面；标识的“复原乳”或“复原奶”字样应醒目，其字号不小于产品名称的字号，字体高度不小于主要展示版面高度的五分之一。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 19644—2010

食品安全国家标准

乳 粉

National food safety standard

Milk powder

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会（CAC）的标准 Codex Stan 207-1999 Codex Standard for Milk Powders and Cream Powder，本标准与 Codex Stan 207-1999 的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 19644-2005《乳粉卫生标准》以及 GB/T 5410-2008《乳粉（奶粉）》中的部分指标，GB/T 5410-2008《乳粉（奶粉）》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与 GB 19644-2005 相比，主要变化如下：

——标准名称改为《乳粉》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官要求”；

——取消了对全脂加糖乳粉指标的要求；

——取消了对脱脂乳粉及部分脱脂乳粉的脂肪要求；

——增加了以羊乳为原料的乳粉产品的复原乳酸度指标；

——增加了杂质度指标；

——“污染物限量”直接引用 GB 2762 的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用 GB 2761 的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——增加了对营养强化剂的要求。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB19644-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳 粉

1 范围

本标准适用于全脂、脱脂、部分脱脂乳粉和调制乳粉。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 乳粉 milk powder

以生牛（羊）乳为原料，经加工制成的粉状产品。

3.2 调制乳粉 formulated milk powder

以生牛（羊）乳或及其加工制品为主要原料，添加其它原料，添加或不添加食品添加剂和营养强化剂，经加工制成的乳固体含量不低于70%的粉状产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 生乳：应符合 GB 19301 的规定。

4.1.2 其它原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2 感官要求：应符合表 1 规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求		检验方法
	乳 粉	调制乳粉	
色泽	呈均匀一致的乳黄色。	具有应有的色泽。	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有纯正的乳香味。	具有应有的滋味、气味。	
组织状态	干燥均匀的粉末。		

4.3 理化指标：应符合表 2 规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2 理化指标

项　　目	指　　标		检验方法
	乳粉	调制乳粉	
蛋白质/(%)　　≥	非脂乳固体[a]的 34%	16.5	GB 5009.5
脂肪[b]/(%)　　≥	26.0	—	GB 5413.3
复原乳酸度/(°T) 牛乳　　≤ 羊乳	 18 7～14	 — —	GB 5413.34
杂质度/(mg/kg)　　≤	16	—	GB 5413.30
水分/(%)　　≤	5.0		GB 5009.3
[a] 非脂乳固体(%)＝100%－脂肪(%)－水分(%)。 [b] 仅适用于全脂乳粉。			

4.4　污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6　微生物限量：应符合表 3 规定。

表 3　微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量（若非指定，均以 CFU/g 表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数[b]	5	2	50000	200000	GB 4789.2
大肠菌群	5	1	10	100	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	2	10	100	GB 4789.10 平板计数法
沙门氏菌	5	0	0 /25g	—	GB 4789.4
[a] 样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。 [b] 不适用于添加活性菌种（好氧和兼性厌氧益生菌）的产品。					

4.7　食品添加剂和营养强化剂

4.7.1　食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.7.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760 和 GB 14880 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 19645—2010

食品安全国家标准

巴氏杀菌乳

National food safety standard

Pasteurized milk

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB 19645-2005《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》以及GB 5408.1-1999《巴氏杀菌乳》中的部分指标，GB 5408.1-1999《巴氏杀菌乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与GB 19645-2005相比，主要变化如下：

——将《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》分为《巴氏杀菌乳》、《灭菌乳》、《调制乳》三个标准，本标准为《巴氏杀菌乳》；

——修改了 “范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官指标”；

——取消了脱脂、部分脱脂产品的脂肪要求；

——增加了羊乳的蛋白质要求；

——将“理化指标”中酸度值的限量要求修改为范围值；

——取消了“兽药残留指标 ”；

——取消了“农药残留指标 ”；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——取消了“食品添加剂”的要求；

——修改了“标识”的规定。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19645-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

巴氏杀菌乳

1 范围

本标准适用于全脂、脱脂和部分脱脂巴氏杀菌乳。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 巴氏杀菌乳 pasteurized milk

仅以生牛（羊）乳为原料，经巴氏杀菌等工序制得的液体产品。

4 技术要求

4.1 原料要求：生乳应符合GB 19301的要求。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.3 理化指标：应符合表2的规定。

表 2 理化指标

项　　目		指　　标	检验方法
脂肪[a]/(g/100g)	≥	3.1	GB 5413.3
蛋白质/(g/100g)			GB 5009.5
牛乳	≥	2.9	
羊乳	≥	2.8	

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2（续）

项　　目	指　　标	检验方法
非脂乳固体/(g/100g)　　≥	8.1	GB 5413.39
酸度/(°T) 牛乳 羊乳	 12～18 6～13	GB 5413.34
[a] 仅适用于全脂巴氏杀菌乳。		

4.4　污染物限量：应符合GB 2762的规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6　微生物限量：应符合表 3 的规定。

表 3　　微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	2	50000	100000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	1	5	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	0	0 /25g(mL)	–	GB 4789.10 定性检验
沙门氏菌	5	0	0 /25 g(mL)	–	GB 4789.4
[a]样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。					

5　其他

5.1　应在产品包装主要展示面上紧邻产品名称的位置，使用不小于产品名称字号且字体高度不小于主要展示面高度五分之一的汉字标注“鲜牛(羊)奶”或“鲜牛(羊)乳”。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 19646—2010

食品安全国家标准
稀奶油、奶油和无水奶油

National food safety standard

Cream，butter and anhydrous milkfat

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会（CAC）的标准 Codex Stan 279-1971（Revision 1999，Amendment 2003, 2006）Codex Standard for Butter, Codex Stan 280-1973（Revision 1999，Amendment 2006）Codex Standard for Milkfat Products，Codex Stan 288-1976（Revision 2003, Amendment 2008）Codex Standard for Cream and Prepared Creams，本标准与 Codex Stan 279-1971（Revision 1999，Amendment 2003，2006）、Codex Stan 280-1973（Revision 1999, Amendment 2006）、Codex Stan 288-1976（Revision 2003, Amendment 2008）的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 19646-2005《奶油、稀奶油卫生标准》以及 GB/T 5415-2008《奶油》中的部分指标，GB/T 5415-2008《奶油》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与 GB 19646-2005 相比，主要变化如下：

——标准名称改为《稀奶油、奶油和无水奶油》；

——修改了“范围”的描述；

——增加了“术语和定义”；

——修改了“感官指标”；

——增加了稀奶油的酸度指标；

——增加了非脂乳固体指标；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——增加了对营养强化剂的要求。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19646-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

稀奶油、奶油和无水奶油

1 范围

本标准适用于稀奶油、奶油和无水奶油。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 稀奶油 cream

以乳为原料，分离出的含脂肪的部分，添加或不添加其它原料、食品添加剂和营养强化剂，经加工制成的脂肪含量10.0%～80.0%的产品。

3.2 奶油 （黄油） butter

以乳和(或)稀奶油（经发酵或不发酵）为原料，添加或不添加其它原料、食品添加剂和营养强化剂，经加工制成的脂肪含量不小于80.0%产品。

3.3 无水奶油（无水黄油） anhydrous milkfat

以乳和(或)奶油或稀奶油（经发酵或不发酵）为原料，添加或不添加食品添加剂和营养强化剂，经加工制成的脂肪含量不小于99.8%的产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 生乳：应符合 GB 19301 的要求。

4.1.2 其它原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2 感官要求：应符合表1的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	呈均匀一致的乳白色、乳黄色或相应辅料应有的色泽。	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有稀奶油、奶油、无水奶油或相应辅料应有的滋味和气味，无异味。	
组织状态	均匀一致，允许有相应辅料的沉淀物，无正常视力可见异物。	

4.3　理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2　理化指标

项　　目	指　　标			检验方法
	稀奶油	奶油	无水奶油	
水分/(%)　　≤	—	16.0	0.1	奶油按 GB 5009.3 的方法测定； 无水奶油按 GB 5009.3 中的卡尔·费休法测定
脂肪/(%)　　≥	10.0	80.0	99.8	GB 5413.3[a]
酸度[b]/(°T)　　≤	30.0	20.0	—	GB 5413.34
非脂乳固体[c]/(%)　≤	—	2.0	—	—
[a]无水奶油的脂肪(%)=100%－水分(%)。 [b]不适用于以发酵稀奶油为原料的产品。 [c]非脂乳固体(%)=100%－脂肪(%)－水分(%)(含盐奶油还应减去食盐含量)。				

4.4　污染物限量：应符合 GB 2762 规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6　微生物限量

4.6.1 以罐头工艺或超高温瞬时灭菌工艺加工的稀奶油产品应符合商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验。

4.6.2 其它产品应符合表 3 的规定。

表 3　微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量（若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数[b]	5	2	10000	100000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	10	100	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	1	10	100	GB 4789.10 平板计数法
沙门氏菌	5	0	0/25g(mL)	—	GB 4789.4

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表3（续）

项　　目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
霉菌　　≤	90				GB 4789.15
[a]样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。 [b]不适用于以发酵稀奶油为原料的产品。					

4.7　食品添加剂和营养强化剂

4.7.1 食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.7.2 食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760 和 GB 14880 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 21703—2010

食品安全国家标准
乳和乳制品中苯甲酸和山梨酸的测定

National food safety standard

Determination of benzoic acid and sorbic acid in milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准修改采用国际乳业联合会标准IDF 139：1987 Milk，dried milk，yogurt and other fermented milks-Determination of benzoic and sorbic acid。

本标准中附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 21703-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳和乳制品中苯甲酸和山梨酸的测定

1 范围

本标准规定了乳与乳制品中苯甲酸和山梨酸含量的测定方法。

本标准适用于乳与乳制品中苯甲酸和山梨酸含量的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

去除试样中的脂肪和蛋白质，甲醇稀释，过滤后，采用反相液相色谱法分离测定。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所使用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

4.2 亚铁氰化钾溶液（92 g/L）：称取亚铁氰化钾[$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] 106 g，用水溶解于 1000 mL 容量瓶中，定容到刻度后混匀。

4.3 乙酸锌溶液（183 g/L）：称取乙酸锌[$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$] 219 g，加入 32 mL 乙酸，用水溶解于 1000 mL 容量瓶中，定容到刻度后混匀。

4.4 磷酸盐缓冲液（pH=6.7）：分别称取 2.5 g 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）和 2.5 g 磷酸氢二钾（$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$）于 1000 mL 容量瓶中，用水定容到刻度后混匀，用滤膜（4.9）过滤后备用。

4.5 氢氧化钠溶液（0.1 mol/L）：称量 4 g 氢氧化钠（NaOH），用水溶解于 1000 mL 容量瓶中，定容到刻度后混匀。

4.6 硫酸溶液（0.5 mol/L）：移取 30 mL 的浓硫酸（H_2SO_4）到 500 mL 水中，边搅拌边缓慢加入，冷却到室温后转移到 1000 mL 容量瓶，定容到刻度后混匀。

4.7 甲醇水溶液：体积分数为 50 %。

4.8 标准溶液

4.8.1 苯甲酸和山梨酸标准贮备液：每毫升含苯甲酸、山梨酸各 500 μg。

准确称取苯甲酸、山梨酸标准品各50.0 mg，分别置于100 mL容量瓶中，用甲醇（4.1）溶解，并稀释至刻度。摇匀后，冷藏于冰箱中，有效期2个月。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.8.2　苯甲酸和山梨酸的混合标准工作液：每毫升含苯甲酸、山梨酸各 10 μg。

分别吸取苯甲酸和山梨酸的标准贮备液（4.8.1）各5 mL，至250 mL的容量瓶中，用甲醇水溶液（4.7）定容至刻度后混匀。冷藏于冰箱中，有效期5 d。

4.9　滤膜：0.45 μm。

5　仪器和设备

5.1　高效液相色谱仪，配有紫外检测器。

5.2　天平：感量为 0.1 mg，0.01 g。

6　分析步骤

6.1　试样制备

6.1.1　液态试样

贮藏在冰箱中的乳与乳制品，应在试验前预先取出，并达室温，称量20 g（精确至0.01g）样品于100 mL容量瓶中。

6.1.2　固态试样

称量3 g（精确至0.01g）样品于100 mL容量瓶中，加10 mL水，用玻璃棒搅拌至完全溶解。

6.2　萃取和净化

向盛有试样（6.1）的容量瓶中加入25 mL氢氧化钠溶液（4.5），混合后置于超声波水浴或70 ℃水浴中处理15 min。冷却后，用硫酸溶液（4.6）将pH调节到8(用pH计或pH试纸均可)，然后加入2 mL亚铁氰化钾溶液（4.2）和2 mL乙酸锌溶液（4.3）。剧烈振摇，静置15 min，混合后冷却到室温，再用甲醇（4.1）定容，静置15 min，上清液经过滤膜（4.9）过滤。收集滤液作为试样溶液，用于高效液相色谱仪（5.1）测定。

6.3　色谱参考条件

色谱柱：C_{18}，250 mm×4.6mm ，5μm。
流动相：甲醇（4.1）—磷酸盐缓冲溶液（4.4）=1＋9。
流速：1.2 mL/min。
检测波长：227 nm。
柱温：室温。
进样量：10 μL。

6.4　测定

准确吸取各不少于2份的10 μL试样溶液（6.2）和苯甲酸和山梨酸的混合标准工作液（4.8.2），以色谱峰面积定量。在上述色谱条件下，出峰顺序依次为苯甲酸、山梨酸，标准溶液的液相色谱图参见附录A中图A.1。

7　分析结果的表述

试样中苯甲酸、山梨酸的含量按式(1)进行计算：

$$X = \frac{A \times c_s \times V}{A_s \times m} \quad \cdots\cdots (1)$$

食品伙伴网http://www.foodmate.net

式中：

X——试样中苯甲酸、山梨酸含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A——试样溶液中苯甲酸、山梨酸的峰面积；

A_s——标准溶液中苯甲酸、山梨酸的峰面积；

c_s——标准溶液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m——取样质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

本方法苯甲酸、山梨酸的检出限均为 1 mg/kg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（资料性附录）

苯甲酸、山梨酸典型色谱图

A.1 高效液相色谱法测定苯甲酸、山梨酸的典型色谱图

高效液相色谱法测定苯甲酸、山梨酸的典型色谱图见图A.1。

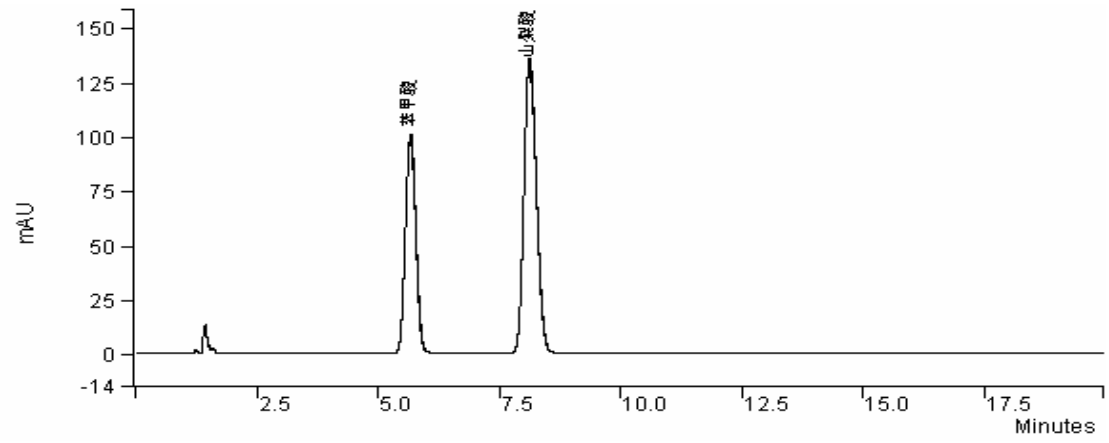


图 A.1 苯甲酸、山梨酸典型色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 22031—2010

食品安全国家标准
干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐的测定

National food safety standard

Determination of added citrate content in cheese and processed cheese products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 22031-2008《干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐含量的测定 酶-比色法》。

本标准附录A、附录B为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 22031-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐的测定

1 范围

本标准规定了干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐含量（以柠檬酸计）的测定方法。

本标准适用于干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐含量的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

测定样品中总柠檬酸盐的含量，扣除原料带入样品中的柠檬酸盐的量（以0.04倍乳糖换算），即为样品中添加的柠檬酸盐含量。柠檬酸盐以柠檬酸计。

4 分析步骤

样品中的总柠檬酸盐的测定和含量计算按附录A的规定执行。

样品中的乳糖的测定和含量计算按附录B的规定执行。

5 分析结果的表述

样品中添加的柠檬酸盐含量按（1）式计算：

$$w_a = w_c - r w_i \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

w_a——样品中添加的柠檬酸盐含量，以柠檬酸计，以质量分数（%）表示；

w_c——样品中总柠檬酸含量，单位为质量分数（%）；

w_i——样品中乳糖含量，单位为质量分数（%）；

r——原料乳清粉或乳粉中柠檬酸含量与乳糖含量的比率（柠檬酸/乳糖）（r = 0.04）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留至小数点后两位。

6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（规范性附录）
干酪及加工干酪制品中柠檬酸盐含量的酶法测定

A.1 范围

本标准适用于酶法测定干酪及加工干酪制品中的柠檬酸盐含量。

A.2 原理

柠檬酸盐裂解酶（CL）将柠檬酸盐转化为草酰乙酸盐和乙酸盐，苹果酸脱氢酶（MDH）和乳酸脱氢酶（LDH）在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）的存在下催化脱羧草酰乙酸盐以及脱羧产物丙酮酸盐，分别转化成L-苹果酸和L-乳酸。NADH在反应中被氧化成了NAD^+。在340 nm处测定样品溶液中NADH的吸光度差值，计算样品中柠檬酸盐的含量。

A.3 试剂和材料

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

A.3.1 三氯乙酸溶液（200 g/L）：称取20 g三氯乙酸（CCl_3COOH）溶于水中，混匀，并定容至100 mL。

A.3.2 氢氧化钠溶液（200 g/L）：称取20 g氢氧化钠（NaOH），用水溶解后转移至100 mL容量瓶中，定容。充分混合。

A.3.3 氢氧化钠溶液（40 g/L）：称取4 g氢氧化钠（NaOH），用水溶解后转移至100 mL容量瓶中，定容。充分混合。

A.3.4 氢氧化钠溶液（4 g/L）：称取0.4 g氢氧化钠（NaOH），用水溶解后转移至100 mL容量瓶中，定容。充分混合。

A.3.5 氯化锌溶液（0.8 g/L）：称取0.8 g氯化锌（$ZnCl_2$），用水溶解后转移至1000 mL容量瓶中，定容。充分混合。

A.3.6 缓冲液（pH 7.8）：称取7.13 g双甘氨肽($H_2NCH_2CONHCH_2CO_2H$)，溶解于70 mL水中，转移至100 mL容量瓶中。用氢氧化钠溶液（A.3.2）调节pH至7.8，加入10 mL氯化锌溶液（A.3.5）并定容至100 mL。充分混合。储存在0 ℃～4 ℃的冰箱中，此溶液可以保存四周。

A.3.7 碳酸氢钠溶液（4.0 g/L）：称取4.0 g碳酸氢钠（$NaHCO_3$），用水溶解后转移至1000 mL容量瓶中，定容。充分混合。

A.3.8 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）溶液：称取50 mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸二钠盐（$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$）和100 mg碳酸氢钠（$NaHCO_3$），溶解于10 mL水中。

A.3.9 硫酸铵溶液（422 g/L）：称取42.2 g硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$]，用水溶解后转移至100 mL容量瓶中，定容。充分混合。

A.3.10 苹果酸脱氢酶（MDH）和乳酸脱氢酶（LDH）悬浊液：用硫酸铵溶液（A.3.9）分别溶解苹果酸脱氢酶（猪心，EC 1.1.1.37）和乳酸脱氢酶（兔肉，EC 1.1.1.27），使苹果酸脱氢酶（MDH）的活性不低于600 IU/mL和乳酸脱氢酶的活性不低于1400 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后，储存在0 ℃～4 ℃冰箱中，此溶液可以保存一年。

A.3.11 柠檬酸盐裂解酶（CL）溶液：用0 ℃水溶解柠檬酸盐裂解酶（产气肠杆菌，EC 4.1.3.6），使柠檬酸盐裂解酶的活性不低于40 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后，储存在0 ℃～4 ℃冰箱中，此溶液可以保存一周；在-20 ℃冰箱中，可以保存四周。

A.3.12 柠檬酸标准溶液（160 μg/mL）：称取175 mg一水柠檬酸（$C_6H_8O_7·H_2O$），用水溶解后转移至1000 mL容量瓶中，定容。充分混合。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.4 仪器和设备

A.4.1 天平：感量为0.1 mg。

A.4.2 pH计：精度为0.1。

A.4.3 粉碎机。

A.4.4 具塞刻度比色管：10 mL，分度值0.1 mL。

A.4.5 中速滤纸。

A.4.6 紫外可见分光光度计：340 nm，1 cm比色皿。

A.4.7 水浴锅。

A.5 试样制备

A.5.1 干酪

除去干酪的外壳或发霉的表层，使试样具代表性。用粉碎机（A.4.3）将试样粉碎，混匀。

A.5.2 干酪制品

选择具有代表性的试样，用粉碎机（A.4.3）粉碎，混匀。

A.6 分析步骤

A.6.1 试液制备

称取1 g（精确至0.0001 g）试样（A.5），溶于50 mL的温水（40 ℃～50 ℃）中，全部转移入100 mL容量瓶中，冷却至20 ℃。再加入10 mL三氯乙酸溶液（A.3.1），用水定容，混合均匀后静置30 min。用滤纸（A.4.5）过滤，弃去初滤液约10 mL。吸取25 mL滤液于烧杯中，用氢氧化钠溶液（A.3.3）调节滤液pH至4后，再用氢氧化钠溶液（A.3.4）调节pH至8。将烧杯中的溶液转移入100 mL容量瓶中，用水定容。同时做空白试验。

A.6.2 测定

A.6.2.1 标准曲线的绘制

试剂在使用前恢复至室温。准确吸取0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00 mL(相当于0、80、160、200、320μg柠檬酸)两组柠檬酸标准溶液（A.3.12）,分别置于10 mL比色管（A.4.4）中，各加入1.00 mL缓冲液（A.3.6）、0.10 mL NADH溶液（A.3.8）、0.02 mL苹果酸脱氢酶（MDH）和乳酸脱氢酶（LDH）悬浊液（A.3.10），摇匀。在20 ℃～25 ℃水浴锅（A.4.7）中保持5 min，用水定容至5.00 mL。其中一组用1 cm比色皿（A.4.6），以空气作参比，在波长340 nm处测定各比色管内溶液的吸光度A_0。另一组各加入0.02 mL的柠檬酸盐裂解酶（A.3.11），混匀，在20 ℃～25 ℃水浴锅（A.4.7）中保持10 min，用1 cm比色皿（A.4.6），以空气作参比，在波长340 nm处测定各比色管内溶液的吸光度A_{10}。根据（2）式计算吸光度A，以柠檬酸含量为纵坐标，吸光度A为横坐标，绘制标准曲线。

$$A=A_0-A_{10} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

A_0——柠檬酸盐裂解酶添加前的吸光度；

A_{10}——柠檬酸盐裂解酶添加后水浴10 min的吸光度。

注：如果吸光度降低超过0.800，用水溶液稀释样品和空白测试，重复A.6.2.1步骤。

A.6.2.2 试液吸光度的测定

用移液管吸取两份2.00 mL试液（A.6.1），置于10 mL比色管(A.4.4)中。以下步骤同A.6.2.1中“各加入1.00 mL缓冲液（A.3.6）……绘制标准曲线”操作，在标准曲线上查出对应的柠檬酸含量。同时做空白试验。

A.7 分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

样品中柠檬酸的含量按式（A.2）计算。

$$X=\frac{c\times V_1\times V_3}{10000\times m\times V_2\times V_4} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X ——样品中柠檬酸的含量，单位为克每百克（g/100g）；

c——标准曲线上查出的试液中柠檬酸的含量，单位为微克（μg）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

V_1——试样经脱蛋白处理后的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2——吸取滤液体积，单位为毫升（mL）；

V_3——滤液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4——吸取试液体积，单位为毫升（mL）。

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

A.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 B
（规范性附录）
干酪及加工干酪中乳糖含量的酶法测定

B.1 范围

本标准适用于酶法测定干酪及加工干酪制品中的乳糖含量。

B.2 原理

在β-半乳糖苷酶（β-GLS）催化下，乳糖被酶解为D-葡萄糖（G）和D-半乳糖（GL）。己糖激酶（HK）将D-葡萄糖磷酸化生成6-磷酸葡萄糖（G6P），同时将三磷酸腺苷（ATP）转化为二磷酸腺苷（ADP）。受6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）催化，6-磷酸葡萄糖氧化为6-磷酸葡萄糖酸（GA6P），同时烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（$NADP^+$）被还原成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）。在波长340 nm处NADPH的吸光度值与乳糖含量成正比，与标准系列比较定量。

$$C_{12}H_{22}O_{11}（L）+H_2O \xrightarrow{\beta\text{-GLS}} D\text{-}C_6H_{12}O_6（G）+ D\text{-}C_6H_{12}O_6（GL）$$

$$D\text{-}C_6H_{12}O_6（G）+ATP \xrightarrow{HK} G6P+ADP$$

$$G6P+NADP^+ + H_2O \xrightarrow{G6PDH} GA6P+NADPH+H^+$$

B.3 试剂和材料

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

B.3.1 乳糖标准物质（$C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$），纯度≥99 %。

B.3.2 亚铁氰化钾溶液(36 g/L)：称取3.6 g亚铁氰化钾{$K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$}，用水溶解，定容至100 mL，混匀。

B.3.3 硫酸锌溶液（72 g/L）：称取7.2 g硫酸锌（$ZnSO_4\cdot 7H_2O$），用水溶解，定容至100 mL，混匀。

B.3.4 硫酸溶液（2 mol/L）：量取60 mL硫酸，缓缓注入适量水中，冷却至室温后用水稀释至1000 L，混匀。

警告：稀释浓硫酸时应当将硫酸缓慢加入水中，且不断搅动。否则会引起爆炸。

B.3.5 氢氧化钠溶液（200 g/L）：称取20.0 g氢氧化钠（NaOH），用水溶解，定容至100 mL，混匀。

B.3.6 氢氧化钠溶液（4 g/L）：称取4.0 g氢氧化钠（NaOH），用水溶解，定容至1000 mL，混匀。

B.3.7 硫酸铵溶液(422 g/L)：称取42.2 g硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$]，用水溶解，定容至100 mL，混匀。

B.3.8 柠檬酸盐缓冲液（pH 6.6）：分别称取2.8 g柠檬酸钠（$C_6H_5O_7Na_3\cdot 2H_2O$），0.042 g柠檬酸（$C_6H_8O_7\cdot H_2O$）和0.635 g七水硫酸镁（$MgSO_4\cdot 7H_2O$）溶于40 mL水中，用硫酸溶液（B.3.4）或者氢氧化钠溶液（B.3.6）调节pH至6.6±0.1后，用水定容至50 mL，混匀后放置0 ℃～4 ℃冰箱中贮藏，可保存三个月，使用前放置至室温。

B.3.9 三乙醇胺（TEA）缓冲液（pH 7.6）：分别称取14.0 g盐酸三乙醇胺（$C_6H_{15}NO_3\cdot HCl$），0.25 g七水硫酸镁（$MgSO_4\cdot 7H_2O$），用 80 mL水溶解，用氢氧化钠溶液（B.3.5）调节pH至7.6±0.1后，定容至100 mL，混匀后放置0 ℃～4 ℃冰箱中贮藏，可保持两个月。

B.3.10 $NADP^+$－ATP－TEA缓冲悬浊液：分别准确称取65 mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠（$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$）和170 mg 5-三磷酸腺苷二钠盐（$C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$），溶于 30 mL的三乙醇胺缓冲液（B.3.9）中，混匀后放置0 ℃～4 ℃冰箱中贮藏可保持两周，使用前放置至室温。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.3.11　β-半乳糖苷酶-硫酸铵[β-GLS-$(NH_4)_2SO_4$]悬浊液(pH约为7.6)：将β-半乳糖苷酶 (β-GLS，埃希氏大肠杆菌，EC 3.2.1.23)溶于硫酸铵溶液（B.3.7）中，使β-半乳糖苷酶的活性不低于60 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后放置0 ℃～4 ℃冰箱中，可保存12个月。使用时该悬浊液的容器应浸入冰水中。

B.3.12　己糖激酶-6-磷酸葡萄糖脱氢酶－硫酸铵[HK-G6PDH-$(NH_4)_2SO_4$]悬浊液：将己糖激酶（HK，酵母，EC 2.7.1.1)和6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH，酵母，EC 1.1.1.49）溶于硫酸铵溶液（B.3.7）中，使己糖激酶活性不低于280 IU/mL（25 ℃），6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性不低于140 IU/mL（25 ℃）。缓慢搅匀成悬浊液后放置0 ℃～4 ℃冰箱中，可保存12个月。使用时该悬浊液的容器应浸入冰水中。

B.3.13　乳糖标准溶液（80 μg/mL）：精确称取经87 ℃烘烤2 h至恒重的乳糖标准物质（B.3.1）0.842 g，溶于水中，定容至100 mL，摇匀。准确吸取1.00 mL上述溶液，用水稀释到100 mL，即得浓度为80 μg/mL乳糖标准工作溶液。该溶液放置0 ℃～4 ℃冰箱中，临用前配制。

B.4　仪器和设备

B.4.1　天平：感量为0.1 mg。

B.4.2　定量滤纸：中速，直径15 cm。

B.4.3　比色管：10 mL，带盖。

B.4.4　分光光度计：340 nm，1 cm比色皿。

B.4.5　水浴锅：能在20 ℃～36 ℃保温。

B.5　分析步骤

B.5.1　试样制备

取有代表性的样品至少200 g，充分混匀，置于密闭的玻璃容器内。

B.5.2　试液的制备

准确称取1 g样品于烧杯。用温水（40 ℃～50 ℃）溶解，玻璃棒搅拌，将烧杯中样品完全转移至100 mL容量瓶，用水定容，混匀。加入5 mL亚铁氰化钾溶液（B.3.2）、5 mL硫酸锌溶液（B.3.3）和10 mL NaOH溶液（B.3.6），每次添加后充分混合溶液，用水定容至100 mL，混合均匀后静置30 min。过滤，弃去开始的部分滤液。吸取5.00 mL滤液于100 mL容量瓶中，用水定容至100 mL，即为试液。

B.5.3　标准曲线的绘制

用微量移液管吸取0.00，0.20，0.40，0.60，0.80，1.00 mL(相当于0, 16, 32, 48, 64, 80μg乳糖)乳糖标准溶液（B.3.13），分别置于比色管（B.4.3）中，各加入0.20 mL柠檬酸盐缓冲溶液（B.3.8）、0.05 mLβ-半乳糖苷酶-硫酸铵悬浊液(B.3.11)，摇匀，于水浴锅（B.4.5）中恒温15 min。取出后加入1.00 mL $NADP^+$－ATP－TEA缓冲溶液（B.3.10），0.05 mL己糖激酶-6-磷酸葡萄糖脱氢酶－硫酸铵悬浊液（B.3.12），摇匀，于水浴锅（B.4.5）中恒温60 min。取出后，冷却至室温，用水定容至5.00 mL，摇匀，放置5 min。用1 cm比色皿（B.4.4），以乳糖标准溶液含量为零的试剂溶液作参比，在波长340 nm处测定各比色管内溶液的吸光度。以乳糖含量为纵坐标，吸光度为横坐标，绘制标准曲线。

B.5.4　试液吸光度的测定

准确吸取 1.00 mL 试液（B.5.2）于比色管（B.4.3）中，加入 0.20 mL 柠檬酸盐缓冲溶液（B.3.8），1.00 mL $NADP^+$-ATP-TEA 缓冲溶液（B.3.10），0.05 mL 己糖激酶-6-磷酸葡萄糖脱氢酶－硫酸铵悬浊液（B.3.12），摇匀，于水浴锅（B.4.5）中恒温 60 min。取出后，冷却至室温，用水定容至 5.00 mL，摇匀，放置 5 min，作为试液参比溶液。

准确吸取 1.00 mL 试液（B.5.2）于比色管（B.4.3）中。以下按 B.5.3“各加入 0.20 mL 柠檬酸缓冲溶液（B.3.8）……放置 5 min”操作，用 1 cm 比色皿（B.4.4），在波长 340 nm 处测定各比色管内溶液的吸光度，在标准曲线上查出对应的乳糖含量。

B.6　分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

试样中乳糖的含量按式（4）计算。

$$X=\frac{c\times V_1\times V_3}{10000\times m\times V_2\times V_4} \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

X ——试样中乳糖的含量，单位为克每百克（g/100g）；

c ——标准曲线上查出的试液中乳糖的含量，单位为微克（μg）；

m ——试料的质量，单位为克（g）；

V_1 ——试料经脱蛋白处理后的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——吸取滤液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——滤液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——吸取试液体积，单位为毫升（mL）。

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

B.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 23790—2010

食品安全国家标准
粉状婴幼儿配方食品良好生产规范

National food safety standard

Good manufacturing practice for powdered formulae for infants and young children

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 23790-2009《婴幼儿配方粉企业良好生产规范》。

本标准参考了国际标准CAC/RCP 66-2008 Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children。

本标准与 GB/T 23790-2009 相比，主要变化如下：

——标准名称改为《粉状婴幼儿配方食品良好生产规范》；

——由推荐性标准改为强制性标准；

——修改了标准条款框架；

——增加了原料采购、验收、运输和贮存相关的要求；

——修改了生产过程的食品安全控制措施，增加了安全控制的特定处理步骤，制定了对热处理、中间贮存、冷却、干混合、内包装等重要工序的控制要求；对微生物、化学、物理污染的重点控制措施参照GB 12693-2010的规定；

——增加了对大豆原料安全性控制的要求；

——增加了食品安全控制措施有效性的监控与评价方法；

——增加附录 A，规定了对清洁作业区环境中主要污染源——沙门氏菌、阪崎肠杆菌和其他肠杆菌进行监控的要求。

本标准的附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 23790-2009。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

粉状婴幼儿配方食品良好生产规范

1 范围

本标准适用于以乳类或大豆及其加工制品为主要原料的粉状婴幼儿配方食品(包括粉状婴儿配方食品、粉状较大婴儿和幼儿配方食品)的生产企业。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 清洁作业区 cleaning work area

清洁度要求高的作业区域，如裸露待包装的半成品贮存、充填及内包装车间等。

3.2 准清洁作业区 quasi-cleaning work area

清洁度要求低于清洁作业区的作业区域，如原辅料预处理车间等。

3.3 一般作业区 commonly work area

清洁度要求低于准清洁作业区的作业区域，如收乳间、原料仓库、包装材料仓库、外包装车间及成品仓库等。

3.4 湿法（生产）工艺 wet-mix process

将粉状婴幼儿配方食品的配料成分在液体状态下进行处理与混合的生产工艺，该工艺通常包括配料、热处理、浓缩、干燥等工序。

3.5 干法（生产）工艺 dry-mix process

将粉状婴幼儿配方食品的配料成分在干燥状态下进行处理与混合而制成最终产品的生产工艺。

3.6 干湿法复合（生产）工艺 combined process

将粉状婴幼儿配方食品的部分配料成分在液体状态下进行处理与混合，干燥后再采用干法工艺添加另一部分干燥配料成分而制成最终产品的生产工艺。

4 选址及厂区环境

应符合GB 12693的相关规定。应远离禽畜养殖场，厂区内不应饲养动物。

5 厂房和车间

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1 设计和布局

5.1.1 应符合GB 12693的相关规定。

5.1.2 厂房和车间应合理设计、建造和规划与生产相适应的相关设施和设备，以防止微生物孳生及污染的侵害，特别是应防止沙门氏菌和阪崎肠杆菌（*Cronobacter*属）的污染，同时避免或尽量减少这些细菌在藏匿地的存在或繁殖。设计中应考虑如下避免微生物孳生的因素：

5.1.2.1 设计时潮湿区域和干燥区域应隔离、分开；应有效控制人员、设备和物料流动造成的污染，防止沙门氏菌和阪崎肠杆菌进入清洁作业区。

5.1.2.2 设计合理的排水设施，地面应平整、保持适当的坡度、防止积水，清洁作业区还应防止凝结水的产生。

5.1.2.3 应防止加工材料的不当堆积，避免因此产生不利于清洁的场所。

5.1.2.4 湿式清洁流程应设计合理，在干燥区域应防止不当的湿式清洁流程致使沙门氏菌和阪崎肠杆菌的产生与传播。

5.1.2.5 应做好穿越建筑物楼板、天花板和墙面的各类管道、电缆与穿孔间隙间的围封和密封。

5.1.3 粉状婴幼儿配方食品生产场所的内部设计和布局，应按生产工艺以及卫生清洁要求进行合理布局。

5.1.4 对于无后续灭菌操作的干加工区域的操作，应在清洁作业区进行，如从干燥（或干燥后）工序至充填和密封包装的操作。

5.1.5 应按照生产工艺和卫生、质量要求，划分作业区洁净级别，原则上分为一般作业区、准清洁作业区和清洁作业区。清洁作业区应安装具有过滤装置的独立的空气净化系统，并保持正压。

5.1.6 不同洁净级别的作业区域之间应设置有效的物理隔离。清洁作业区应保持对其他区域的正压，防止未净化的空气进入清洁作业区而造成交叉污染。

5.1.7 对于清洁作业区出入应有合理的限制和控制措施，以避免或减少致病菌污染。进出清洁作业区的人员、原料、包装材料、废物、设备等，应有防止交叉污染的措施，如设置人员更衣室更换工作服、工作鞋或鞋套，专用物流通道以及废物通道等。对于通过管道运输的原料或产品进入清洁作业区，需要设计和安装适当的空气过滤系统。

5.1.8 各作业区净化级别应满足粉状婴幼儿配方食品加工对空气净化的需要。清洁作业区和准清洁作业区的空气洁净度应符合表 1 的要求，并应定期进行检测。

表 1 清洁作业区和准清洁作业区的空气洁净度控制要求

区域		细菌总数（cfu/皿）	检验方法
清洁作业区	≤	30	按 GB/T 18204.1 中自然沉降法测定
准清洁作业区	≤	50	

5.1.9 清洁作业区应保持干燥，尽量减少供水设施及系统；如无法避免，则应有防护措施，且不应穿越主要生产作业面的上部空间，防止二次污染的发生。

5.1.10 厂房、车间、仓库应有防止昆虫和老鼠等动物进入的设施。

5.2 内部建筑结构

应符合 GB 12693 的相关规定。

5.3 设施

5.3.1 供水设施

应符合GB 12693的相关规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.3.2 排水系统

应符合GB 12693的相关规定。在清洁作业区内，应设置适当的设施或采用适当措施保持干燥，以避免水残余物的产生而导致相关微生物的增长和扩散。

5.3.3 清洁设施

5.3.3.1 应符合GB 12693的相关规定。

5.3.3.2 对需保持干燥的清洁作业区应采用如下措施：

a）采用适用于场所和设备的干式清洁流程；

b）如果无法采用干式清洁措施，可在受控条件下采用湿式清洁，但应确保能够及时彻底的恢复设备和环境的干燥，使该区域不被污染。

5.3.4 个人卫生设施

5.3.4.1 应符合GB 12693的相关规定。

5.3.4.2 更衣室及洗手消毒室应设置在员工进入加工车间入口附近或适当处。洗手消毒室内应配置足够数量的非手动式水龙头、消毒和自动感应式干手设施。

5.3.4.3 车间入口处应设置保洁措施，以防止鞋靴对车间的污染。

5.3.4.4 清洁作业区的入口应设置二次更衣室，进入清洁作业区前设置手消毒设施。

5.3.5 通风设施

应符合GB 12693的相关规定。

5.3.6 照明设施

应符合GB 12693的相关规定。

5.3.7 仓储设施

应符合GB 12693的相关规定。

6 设备

6.1 生产设备

6.1.1 一般要求

应符合 GB 12693 的相关规定。

6.1.2 材质

应符合 GB 12693 的相关规定。

6.1.3 设计

6.1.3.1 生产设备应符合GB 12693的相关规定。

6.1.3.2 粉状婴幼儿配方食品的生产分干法工艺和湿法工艺（包括干湿法复合工艺），应按工艺需要配备相应的生产设备。

6.1.3.3 生产设备应有明显的运行状态标识，并定期维修、保养和验证。设备安装、维修、保养的操作不应影响产品的质量。维修后的设备应进行验证或确认，确保各项性能满足工艺要求。不合格的设备应搬出生产区，未搬出前应有明显标志。

6.1.3.4 用于食品、清洁食品接触面或设备的压缩空气或其它惰性气体应进行过滤净化处理，以防止造成间接污染。

6.2 监控设备

应符合 GB 12693 的相关规定。

6.3 设备的保养和维修

食品伙伴网http://www.foodmate.net

应符合 GB 12693 的相关规定。

7 卫生管理

7.1 卫生管理制度

应符合 GB 12693 的相关规定。

7.2 厂房及设施卫生管理

应符合 GB 12693 的相关规定。

7.3 清洁和消毒

7.3.1 应符合 GB 12693 的相关规定。

7.3.2 在需干式作业的清洁作业区（如干混、充填包装等），对生产设备和加工环境实施有效的干式清洁流程是防止微生物繁殖的最有效方法，应尽量避免湿式清洁。湿式清洁应仅限于可以搬运到专门房间的设备零件或者在湿式清洁后可以立即采取干燥措施的情况。

7.3.3 应制定有效的监督流程，以确保关键流程（如人工清洁、就地清洗操作（CIP）以及设备维护）符合相关规定和标准要求，尤其要确保清洁和消毒方案的适用性，清洁剂和消毒剂的浓度适当，CIP系统符合相关温度和时间要求，且设备在必要时应进行合理的冲洗。

7.3.4 所有生产车间应制定清洗（或清洁）和消毒的周期表，保证所有区域均被清洁，对重要区域、设备和器具应进行特殊的清洁。

7.3.5 应保证清洁人员的数量并根据需要明确每个人的责任；所有的清洁人员均应接受良好的培训，清楚污染的危害性和防止污染的重要性；应对清洗和消毒做好记录。

7.4 人员健康与卫生要求

7.4.1 应符合 GB 12693 的相关规定。

7.4.2 清洁作业区的员工应穿着符合该区域卫生要求的工作服（或一次性工作服），并配备帽子、口罩和工作鞋。准清洁作业区及一般作业区的员工应穿着符合相应区域卫生要求的工作服，并配备帽子和工作鞋。清洁作业区及准清洁作业区使用的工作服和工作鞋不能在指定区域以外的地方穿着。

7.5 虫害控制

应符合 GB 12693 的相关规定。

7.6 废弃物处理

应符合 GB 12693 的相关规定。

7.7 有毒有害物管理

应符合 GB 12693 的相关规定。

7.8 污水、污物管理

应符合 GB 12693 的相关规定。

7.9 工作服管理

应符合 GB 12693 的相关规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

8 原料和包装材料的要求

8.1 一般要求

应符合 GB 12693 的相关规定。使用的原料应符合相应的国家标准和（或）相关法规的要求，应保证婴幼儿的安全，满足营养需要，不应使用或添加危害婴幼儿营养与健康的物质及非食用物质。

8.2 原料和包装材料的采购和验收要求

8.2.1 应符合 GB 12693 的相关规定。

8.2.2 对直接进入干混合工序的原料，企业应采取措施确保原料微生物指标符合产品标准要求，对大豆原料应确保脲酶活性为阴性。应对供应商采用的流程和安全措施进行评估，必要时应进行定期现场评审或对流程进行监控。

8.3 原料和包装材料的运输和贮存要求

8.3.1 应符合 GB 12693 的相关规定。

8.3.2 食品添加剂及食品营养强化剂应由专人负责管理，设置专库或专区存放，并使用专用登记册（或仓库管理软件）记录添加剂及营养强化剂的名称、进货时间、进货量和使用量等，还应注意其有效期限。

8.3.3 对贮存期间质量容易发生变化的维生素和微量元素等营养强化剂应进行原料合格验证，必要时进行检验，以确保其符合原料规定的要求。

8.4 保存原料和包装材料采购、验收、贮存和运输记录

9 生产过程的食品安全控制

9.1 微生物污染的控制

9.1.1 应符合 GB 12693 的相关规定。

9.1.2 当对控制措施的监控结果表明有偏离时，应采取适当的纠正措施。

9.2 化学污染的控制

应符合 GB 12693 的相关规定。

9.3 物理污染的控制

应符合 GB 12693 的相关规定。

9.4 食品添加剂和食品营养强化剂

应符合 GB 12693 的相关规定。

9.5 包装材料

应符合 GB 12693 的相关规定。

9.6 特定处理步骤

粉状婴幼儿配方食品的生产工艺中各处理工序应分别符合相应的干法工艺或湿法工艺特定处理步骤的要求，并应符合如下规定：

9.6.1 热处理 （湿法和干湿法复合生产工艺）

食品伙伴网http://www.foodmate.net

热处理工序应作为确保粉状婴幼儿配方食品安全的关键控制点。热处理温度和时间应考虑产品属性等因素（如脂肪含量、总固形物含量等）对杀菌目标微生物耐热性的影响。因此应制定相关流程检查温度和时间是否偏离，并采取恰当的纠正措施。

如购进的大豆原料没有经过加热灭酶处理（或灭酶不彻底），此类豆基产品应通过热处理同时达到杀灭致病菌和彻底灭酶的效果（脲酶为阴性），并作为关键控制点进行监控。

热处理中时间、温度、灭酶时间等关键工艺参数应有记录。

9.6.2 中间贮存

在湿法和干湿法复合工艺中，对液态半成品中间贮存应采取相应的措施防止微生物的生长。干法生产中裸露的原料粉或湿法生产中裸露的粉状半成品应保持在清洁作业区。

9.6.3 从热处理到干燥的工艺步骤

从热处理到干燥前的所有输送管道和设备应保持密闭，并定期进行彻底的清洗消毒。

9.6.4 冷却

在湿法和干湿法复合工艺生产中，干燥后的裸露半成品粉末应在清洁作业区内冷却。

9.6.5 干混合

在干法工艺和干湿法复合工艺中，干混合时应对如下关键因素进行控制：

9.6.5.1 与空气环境接触的裸粉工序（如预混及分装、配料、投料）需在清洁作业区内进行。清洁作业区的温度和相对湿度应与粉状婴幼儿配方食品的生产工艺相适应。无特殊要求时，温度应不高于25℃，相对湿度应在65%以下。

9.6.5.2 配料应计量准确。

9.6.5.3 与混合均匀性有关的关键工艺参数（如混合时间等）应予以验证；对混合的均匀性应进行确认。

9.6.5.4 与物料接触的设备内壁应光滑、平整、无死角，易于清洗、耐腐蚀，且其内表层应采用不与物料反应、不释放出微粒及不吸附物料的材料。

9.6.5.5 正压输送物料所需的压缩空气，需经过除油、除水、洁净过滤及除菌处理后方可使用。

9.6.5.6 原料、包装材料、人员应制定严格的卫生控制要求。原料应经必要的保洁程序和物料通道进入作业区，应遵循去除外包装，或经过外包装消毒的处理程序。作业人员应经二次更衣和手的清洁与消毒等处理程序进入清洁作业区，确保相关人员手的卫生，穿工作服，戴上头罩，换鞋或穿上鞋罩。

9.6.6 内包装工序

应对如下关键因素进行控制：

9.6.6.1 内包装工序应在清洁作业区内进行。

9.6.6.2 应只允许相关工作人员进入包装室，原料和包装材料、人员的要求参照9.6.5.6的规定。

9.6.6.3 使用前应检查包装材料的外包装是否完好，以确保包装材料未被污染。

9.6.6.4 生产企业应采用有效的异物控制措施，预防和检查异物，如设置筛网、强磁铁、金属探测器等，对这些措施应实施过程监控或有效性验证。

9.6.6.5 不同品种的产品在同一条生产线上生产时，应有效清洁并保存清场记录，确保产品切换不对下一批产品产生影响。

9.6.7 生产用水的控制

与食品直接接触的生产用水、设备清洗用水等应符合GB 5749的相关规定。循环水、冰和蒸汽等其他用水应符合GB 12693的相关规定。

9.7 产品信息和标签

9.7.1 产品标签应符合GB 13432和相应产品国家标准及国家其它相关法规的规定。

9.7.2 标签中应标示产品的冲调方法、冲调用水及贮存方法等信息，应指导消费者在冲调和处理产品以及喂养过程中避免可能因使用产品不当而引起食源性疾病的做法。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10 检验

10.1 应符合 GB 12693 的相关规定。

10.2 应逐批抽取代表性成品样品，包括每天包装后的第一个成品及其他抽样成品，按国家相关法规和标准的规定进行检验。

11 产品的贮存和运输

应符合 GB 12693 的相关规定。

12 产品追溯和召回

应符合 GB 12693 的相关规定。

13 培训

应符合 GB 12693 的相关规定。

14 管理机构和人员

应符合 GB 12693 的相关规定。

15 记录与文件的管理

15.1 记录管理

应符合 GB 12693 的相关规定。

15.2 文件管理

应符合 GB 12693 的相关规定。

16 食品安全控制措施有效性的监控与评价

采用附录 A 的监控与评价措施，确保食品安全控制措施的有效性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
粉状婴幼儿配方食品清洁作业区沙门氏菌、阪崎肠杆菌和其他肠杆菌的环境监控指南

A.1 由于在卫生条件良好的生产环境中也有可能存在少量的肠杆菌（Enterobacteriaece，简称EB），包括阪崎肠杆菌（*Cronobacter*属），使经巴氏杀菌后的产品有可能被环境污染，导致终产品中存在微量的肠杆菌。因此应监控生产环境中的肠杆菌，以便确认卫生控制程序是否有效，出现偏差时生产企业应及时采取纠正措施。通过持续监控，获得卫生情况的基础数据，并跟踪趋势的变化。据有关工厂实践表明，降低环境中肠杆菌数量可以减少终产品中肠杆菌（包括阪崎肠杆菌和沙门氏菌）的数量。

为防止污染事件的发生，避免抽样检测终产品中微生物的局限性，应制定环境监控计划。监控计划可作为一种食品安全管理工具，用来对清洁作业区（干燥区域）卫生状况实施评估，并作为HACCP的基础程序。

在制定监控计划时应考虑以下沙门氏菌、阪崎肠杆菌及其他肠杆菌的生态学特征等因素：

A.1.1沙门氏菌在干燥环境中极少发现，但还应制定监控计划来预防沙门氏菌的进入，评估生产环境中卫生控制措施的有效性，指导有关人员在检出沙门氏菌的情况下，防止其进一步扩散。

A.1.2阪崎肠杆菌比沙门氏菌更容易在干燥环境中发现。如果采用适当的取样和测试方法，阪崎肠杆菌更易被检出。应制定监控计划来评估阪崎肠杆菌数量是否增长，并采取有效措施防止其增长。

A.1.3肠杆菌散布广泛，是干燥环境的常见菌群，且容易检测。肠杆菌可作为生产过程及环境卫生状况的指标菌。

A.2 在设计取样方案时应考虑的因素

A.2.1 产品种类和工艺过程

应根据产品特点、消费者年龄和健康状况来确定取样方案的需求和范围。本标准中各类产品都将沙门氏菌规定为致病菌，部分产品将阪崎肠杆菌规定为致病菌。

监控的重点应放在微生物容易藏匿孳生的区域，如干燥环境的清洁作业区。应特别关注该区域与相邻较低卫生级别区域的交界处及靠近生产线和设备且容易发生污染的地方，如封闭设备上用于偶尔检查的开口。应优先监控已知或可能存在污染的区域。

A.2.2 样本的种类

监控计划应包括如下两种样本：

A.2.2.1 从不接触食品的表面采样，如设备外部、生产线周围的地面、管道和平台。在这些情况下，污染风险程度和污染物含量将取决于生产线和设备的位置和设计。

A.2.2.2 从直接接触食品的表面采样，如从喷粉塔到包装前之间可能直接污染产品的设备，如筛尾的结团配方粉因吸收水分，微生物容易孳生。如果食品接触表面存在指标菌、阪崎肠杆菌或沙门氏菌，表明产品受污染的风险很高

A.2.3 目标微生物

沙门氏菌和阪崎肠杆菌是主要的目标微生物，但可将肠杆菌作为卫生指标。肠杆菌的含量显示了沙门氏菌存在的可能性，以及沙门氏菌和阪崎肠杆菌生长的条件。

A.2.4 取样点和样本数量

样本数量应随着工艺和生产线的复杂程度而变化。

取样点应为微生物可能藏匿或进入而导致污染的地方。可以根据有关文献资料确定取样点，也可以根据经验和专业知识或者工厂污染调查中收集的历史数据确定取样点。应定期评估取样点，并根据特殊情况，如重大维护、施工活动、或者卫生状况变差时，在监控计划中增加必要的取样点。

取样计划应全面，且具有代表性，应考虑不同类型生产班次以及这些班次内的不同时间段进行科学合理取样。为验证清洁措施的效果，应在开机生产前取样。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.2.5 取样频率

应根据A.2.1的因素决定取样的频率，按照在监控计划中现有各区域微生物存在的数据来确定。如果没有此类数据，应收集充分的资料，以确定合理的取样频率，包括长期收集沙门氏菌或阪崎肠杆菌的发生情况。

应根据检测结果和污染风险严重程度来调整环境监控计划实施的频率。当终产品中检出致病菌或指标菌数量增加时，应加强环境取样和调查取样，以确定污染源。当污染风险增加时（比如进行维护、施工、或湿清洁之后），也应适当增加取样频率。

A.2.6 取样工具和方法

应根据表面类型和取样地点来选择取样工具和方法，如刮取表面残留物或吸尘器里的粉尘直接作为样本，对于较大的表面，采用海绵（或棉签）进行擦拭取样。

A.2.7 分析方法

分析方法应能够有效检出目标微生物，具有可接受的灵敏度，并有相关记录。在确保灵敏度的前提下，可以将多个样品混在一起检测。如果检出阳性结果，应进一步确定阳性样本的位置。如果需要，可以用基因技术分析阪崎肠杆菌来源以及粉状婴幼儿配方食品污染路径的有关信息。

A.2.8 数据管理

监控计划应包括数据记录和评估系统，如趋势分析。一定要对数据进行持续的评估，以便对监控计划进行适当修改和调整。对肠杆菌和阪崎肠杆菌数据实施有效管理，有可能发现被忽视的轻度或间断性污染。

A.2.9 阳性结果纠偏措施

监控计划的目的是发现环境中是否存在目标微生物。在制定监控计划前，应制定接受标准和应对措施。监控计划应规定具体的行动措施并阐明相应原因。相关措施包括：不采取行动（没有污染风险）、加强清洁、污染源追踪（增加环境测试）、评估卫生措施、扣留和测试产品。

生产企业应制定检出肠杆菌和阪崎肠杆菌后的行动措施，以便在出现超标时准确应对。对卫生程序和控制措施应进行评估。当检出沙门氏菌时应立即采取纠偏行动，并且评估阪崎肠杆菌趋势和肠杆菌数量的变化，具体采取哪种行动取决于产品被沙门氏菌和阪崎肠杆菌污染的可能性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 25190—2010

食品安全国家标准

灭菌乳

National food safety standard

Sterilized milk

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB 19645-2005《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》及GB 5408.2-1999《灭菌乳》中的部分指标，GB 5408.2-1999《灭菌乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与GB 19645-2005相比，主要变化如下：

——将《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》分为《巴氏杀菌乳》、《灭菌乳》、《调制乳》三个标准，本标准为《灭菌乳》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官指标”；

——取消了脱脂、部分脱脂产品的脂肪要求；

——增加了羊乳的蛋白质要求；

——将“理化指标”中酸度值的限量要求修改为范围值；

——取消了“兽药残留指标”；

——取消了“农药残留指标”；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——取消了“食品添加剂”的要求；

——修改了“标识”的规定。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19645-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

灭菌乳

1　范围

本标准适用于全脂、脱脂和部分脱脂灭菌乳。

2　规范性引用文件

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

3　术语和定义

3.1　超高温灭菌乳 ultra high-temperature milk

以生牛（羊）乳为原料，添加或不添加复原乳，在连续流动的状态下，加热到至少132℃并保持很短时间的灭菌，再经无菌灌装等工序制成的液体产品。

3.2　保持灭菌乳 retort sterilized milk

以生牛（羊）乳为原料，添加或不添加复原乳，无论是否经过预热处理，在灌装并密封之后经灭菌等工序制成的液体产品。

4　技术要求

4.1　原料要求

4.1.1 生乳：应符合GB 19301的规定。

4.1.2 乳粉：应符合GB 19644的规定。

4.2　感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.3　理化指标：应符合表 2 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2　理化指标

项　　目	指　　标	检验方法
脂肪[a]/(g/100g)　　≥	3.1	GB 5413.3
蛋白质/(g/100g) 牛乳　　≥ 羊乳　　≥	 2.9 2.8	GB 5009.5
非脂乳固体/(g/100g)　　≥	8.1	GB 5413.39
酸度/(°T) 牛乳 羊乳	 12～18 6～13	GB 5413.34
[a]仅适用于全脂灭菌乳。		

4.4　污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6　微生物要求：应符合商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验。

5　其他

5.1 仅以生牛（羊）乳为原料的超高温灭菌乳应在产品包装主要展示面上紧邻产品名称的位置，使用不小于产品名称字号且字体高度不小于主要展示面高度五分之一的汉字标注“纯牛（羊）奶”或“纯牛（羊）乳”。

5.2 全部用乳粉生产的灭菌乳应在产品名称紧邻部位标明“复原乳”或“复原奶”；在生牛（羊）乳中添加部分乳粉生产的灭菌乳应在产品名称紧邻部位标明“含××%复原乳”或“含××%复原奶”。

注：“××%”是指所添加乳粉占灭菌乳中全乳固体的质量分数。

5.3 “复原乳”或“复原奶”与产品名称应标识在包装容器的同一主要展示版面；标识的“复原乳”或“复原奶”字样应醒目，其字号不小于产品名称的字号，字体高度不小于主要展示版面高度的五分之一。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 25191—2010

食品安全国家标准

调制乳

National food safety standard

Modified milk

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB 19645-2005《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》以及GB 5408.1-1999《巴氏杀菌乳》、GB 5408.2-1999《灭菌乳》中的部分指标，GB 5408.1-1999《巴氏杀菌乳》、GB 5408.2-1999《灭菌乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与GB 19645-2005相比，主要变化如下：

——将《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》分为《巴氏杀菌乳》、《灭菌乳》、《调制乳》三个标准，本标准为《调制乳》。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19645-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

调制乳

1　范围

本标准适用于全脂、脱脂和部分脱脂调制乳。

2　规范性引用文件

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

3　术语和定义

3.1　调制乳　modified　milk

以不低于 80%的生牛（羊）乳或复原乳为主要原料，添加其他原料或食品添加剂或营养强化剂，采用适当的杀菌或灭菌等工艺制成的液体产品。

4　技术要求

4.1　原料要求

4.1.1 生乳：应符合GB 19301的规定。

4.1.2 其他原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2　感官要求：应符合表1的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	呈调制乳应有的色泽。	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有调制乳应有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、可有与配方相符的辅料的沉淀物、无正常视力可见异物。	

4.3　理化指标：应符合表2的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2　理化指标

项　　目	指　　标	检验方法
脂肪[a]/(g/100g)　　≥	2.5	GB 5413.3
蛋白质/(g/100g)　　≥	2.3	GB 5009.5
[a]仅适用于全脂产品。		

4.4　污染物限量：应符合GB 2762的规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合GB 2761的规定。

4.6　微生物要求

4.6.1　采用灭菌工艺生产的调制乳应符合商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验。

4.6.2　其它调制乳应符合表 3 的规定。

表3 微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	2	50000	100000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	1	5	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	0	0 /25 g(mL)	–	GB 4789.10 定性检验
沙门氏菌	5	0	0 /25 g(mL)	–	GB 4789.4
[a]样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。					

4.7 食品添加剂和营养强化剂

4.7.1　食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.7.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760 和 GB 14880 的规定。

5 其他

5.1 全部用乳粉生产的调制乳应在产品名称紧邻部位标明“复原乳”或“复原奶”；在生牛（羊）乳中添加部分乳粉生产的调制乳应在产品名称紧邻部位标明“含××%复原乳”或“含××%复原奶”。

注：“××%”是指所添加乳粉占调制乳中全乳固体的质量分数。

5.2 “复原乳”或“复原奶”与产品名称应标识在包装容器的同一主要展示版面；标识的“复原乳”或“复原奶”字样应醒目，其字号不小于产品名称的字号，字体高度不小于主要展示版面高度的五分之一。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 25192—2010

食品安全国家标准

再制干酪

National food safety standard

Process(ed) cheese

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会（CAC）的标准Codex Stan 285-1978（Amendment 2008） Codex General Standard for Named Variety Process(ed) Cheese and Spreadable Process(ed) Cheese, Codex Stan 286-1978（Amendment 2008）Codex General Standard for Process(ed) Cheese and Spreadable Process(ed) Cheese，Codex Stan 287-1978（Amendment 2008）Codex General Standard for Process(ed) Cheese Preparations (Process(ed) Cheese Food and Process(ed) Cheese Spread)。本标准与Codex Stan 285-1978（Amendment 2008）、Codex Stan 286-1978（Amendment 2008）、Codex Stan 287-1978（Amendment 2008）的一致性程度为非等效。微生物指标对应于欧盟Commission Regulation（EC）No 1441/2007 of 5 December 2007相关规定，本标准与其一致性程度为非等效。

本标准系首次发布。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

再制干酪

1 范围

本标准适用于再制干酪。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 再制干酪 process(ed) cheese

以干酪（比例大于15%）为主要原料，加入乳化盐，添加或不添加其它原料，经加热、搅拌、乳化等工艺制成的产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 干酪：应符合 GB 5420 的规定。

4.1.2 其它原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	色泽均匀。	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	易溶于口，有奶油润滑感，并有产品特有的滋味、气味。	
组织状态	外表光滑；结构细腻、均匀、润滑，应有与产品口味相关原料的可见颗粒。无正常视力可见的外来杂质。	

4.3 理化指标：应符合表 2 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2　理化指标

项　　目	指　　标					检验方法
脂肪(干物中)[a] (X_1)/(%)	60.0≤ X_1 ≤75.0	45.0≤ X_1 ＜60.0	25.0≤ X_1＜45.0	10.0≤ X_1＜25.0	X_1 ＜10.0	GB 5413.3
最小干物质含量[b] (X_2)/(%)	44	41	31	29	25	GB 5009.3
[a] 干物质中脂肪含量(%)：X_1=[再制干酪脂肪质量/(再制干酪总质量－再制干酪水分质量)]×100%。 [b] 干物质含量(%)：X_2=[(再制干酪总质量－再制干酪水分质量)/再制干酪总质量]×100%。						

4.4　污染物限量：应符合GB 2762的规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6　微生物限量：应符合表 3 的规定。

表 3　微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以 CFU/g 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	2	100	1000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	100	1000	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	2	100	1000	GB 4789.10 平板计数法
沙门氏菌	5	0	0 /25g	—	GB 4789.4
单核细胞增生李斯特氏菌	5	0	0 /25g	—	GB 4789.30
酵母　　≤	50				GB 4789.15
霉菌　　≤	50				
[a]样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。					

4.7　食品添加剂和营养强化剂

4.7.1　食品添加剂和营养强化剂的质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.7.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760 和 GB 14880 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.1—2010

食品安全国家标准
食品微生物学检验 总则

National food safety standard

Food microbiological examination: General guidelines

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 4789.1-2008《食品卫生微生物学检验 总则》。

本标准与GB/T 4789.1-2008 相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——修改了检验方法的选择。

本标准所代替标准的历年版本发布情况为：

——GB 4789.1-1984、GB 4789.1-1994、GB/T 4789. 1-2003、GB/T 4789. 1-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　总则

1　范围

本标准规定了食品微生物学检验基本原则和要求。

本标准适用于食品微生物学检验。

2　规范性引用文件

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

3　实验室基本要求

3.1　环境

3.1.1　实验室环境不应影响检验结果的准确性。

3.1.2　实验室的工作区域应与办公室区域明显分开。

3.1.3　实验室工作面积和总体布局应能满足从事检验工作的需要，实验室布局应采用单方向工作流程，避免交叉污染。

3.1.4　实验室内环境的温度、湿度、照度、噪声和洁净度等应符合工作要求。

3.1.5　一般样品检验应在洁净区域[包括超净工作台或洁净实验室]进行，洁净区域应有明显的标示。

3.1.6　病原微生物分离鉴定工作应在二级生物安全实验室（Biosafety level 2, BSL-2）进行。

3.2　人员

3.2.1　检验人员应具有相应的教育、微生物专业培训经历，具备相应的资质，能够理解并正确实施检验。

3.2.2　检验人员应掌握实验室生物检验安全操作知识和消毒知识。

3.2.3　检验人员应在检验过程中保持个人整洁与卫生，防止人为污染样品。

3.2.4　检验人员应在检验过程中遵守相关预防措施的规定，保证自身安全。

3.2.5　有颜色视觉障碍的人员不能执行涉及到辨色的实验。

3.3　设备

3.3.1　实验设备应满足检验工作的需要。

3.3.2　实验设备应放置于适宜的环境条件下，便于维护、清洁、消毒与校准，并保持整洁与良好的工作状态。

3.3.3　实验设备应定期进行检查、检定（加贴标识）、维护和保养，以确保工作性能和操作安全。

3.3.4　实验设备应有日常性监控记录和使用记录。

3.4　检验用品

食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.4.1 常规检验用品主要有接种环（针）、酒精灯、镊子、剪刀、药匙、消毒棉球、硅胶（棉）塞、微量移液器、吸管、吸球、试管、平皿、微孔板、广口瓶、量筒、玻棒及L形玻棒等。

3.4.2 检验用品在使用前应保持清洁和/或无菌。常用的灭菌方法包括湿热法、干热法、化学法等。

3.4.3 需要灭菌的检验用品应放置在特定容器内或用合适的材料（如专用包装纸、铝箔纸等）包裹或加塞，应保证灭菌效果。

3.4.4 可选择适用于微生物检验的一次性用品来替代反复使用的物品与材料（如培养皿、吸管、吸头、试管、接种环等）。

3.4.5 检验用品的储存环境应保持干燥和清洁,已灭菌与未灭菌的用品应分开存放并明确标识。

3.4.6 灭菌检验用品应记录灭菌/消毒的温度与持续时间。

3.5 培养基和试剂

3.5.1 培养基

培养基的制备和质量控制按照GB/T 4789.28的规定执行。

3.5.2 试剂

检验试剂的质量及配制应适用于相关检验。对检验结果有重要影响的关键试剂应进行适用性验证。

3.6 菌株

3.6.1 应使用微生物菌种保藏专门机构或同行认可机构保存的、可溯源的标准或参考菌株。

3.6.2 应对从食品、环境或人体分离、纯化、鉴定的，未在微生物菌种保藏专门机构登记注册的原始分离菌株（野生菌株）进行系统、完整的菌株信息记录，包括分离时间、来源，表型及分子鉴定的主要特征等。

3.6.3 实验室应保存能满足实验需要的标准或参考菌株，在购入和传代保藏过程中，应进行验证试验，并进行文件化管理。

4 样品的采集

4.1 采样原则

4.1.1 根据检验目的、食品特点、批量、检验方法、微生物的危害程度等确定采样方案。

4.1.2 应采用随机原则进行采样，确保所采集的样品具有代表性。

4.1.3 采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

4.1.4 样品在保存和运输的过程中，应采取必要的措施防止样品中原有微生物的数量变化，保持样品的原有状态。

4.2 采样方案

4.2.1 类型

采样方案分为二级和三级采样方案。二级采样方案设有n、c和m值，三级采样方案设有n、c、m和M值。

n：同一批次产品应采集的样品件数；

c：最大可允许超出m值的样品数；

m：微生物指标可接受水平的限量值；

M： 微生物指标的最高安全限量值。

注1： 按照二级采样方案设定的指标，在n个样品中，允许有≤c个样品其相应微生物指标检验值大于m值。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

注2： 按照三级采样方案设定的指标，在n个样品中，允许全部样品中相应微生物指标检验值小于或等于m值；允许有≤c个样品其相应微生物指标检验值在m值和M值之间；不允许有样品相应微生物指标检验值大于M值。

例如：n=5，c=2，m=100 CFU/g，M=1 000 CFU/g。含义是从一批产品中采集5个样品，若5个样品的检验结果均小于或等于m值（≤100 CFU/g），则这种情况是允许的；若≤2个样品的结果（X）位于m值和M值之间（100 CFU/g <X≤1 000 CFU/g），则这种情况也是允许的；若有3个及以上样品的检验结果位于m值和M值之间，则这种情况是不允许的；若有任一样品的检验结果大于M值（>1 000 CFU/g），则这种情况也是不允许的。

4.2.2 各类食品的采样方案

按相应产品标准中的规定执行。

4.2.3 食源性疾病及食品安全事件中食品样品的采集

4.2.3.1 由工业化批量生产加工的食品污染导致的食源性疾病或食品安全事件，食品样品的采集和判定原则按4.2.1和4.2.2执行。同时，确保采集现场剩余食品样品。

4.2.3.2 由餐饮单位或家庭烹调加工的食品导致的食源性疾病或食品安全事件，食品样品的采集按GB 14938中卫生学检验的要求，以满足食源性疾病或食品安全事件病因判定和病原确证的要求。

4.3 各类食品的采样方法

采样应遵循无菌操作程序，采样工具和容器应无菌、干燥、防漏，形状及大小适宜。

4.3.1 即食类预包装食品

取相同批次的最小零售原包装，检验前要保持包装的完整，避免污染。

4.3.2 非即食类预包装食品

原包装小于500 g的固态食品或小于500 mL的液态食品，取相同批次的最小零售原包装；大于500 mL的液态食品，应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体，使其达到均质后分别从相同批次的n个容器中采集5倍或以上检验单位的样品；大于500 g的固态食品，应用无菌采样器从同一包装的几个不同部位分别采取适量样品，放入同一个无菌采样容器内，采样总量应满足微生物指标检验的要求。

4.3.3 散装食品或现场制作食品

根据不同食品的种类和状态及相应检验方法中规定的检验单位，用无菌采样器现场采集5倍或以上检验单位的样品，放入无菌采样容器内，采样总量应满足微生物指标检验的要求。

4.3.4 食源性疾病及食品安全事件的食品样品

采样量应满足食源性疾病诊断和食品安全事件病因判定的检验要求。

4.4 采集样品的标记

应对采集的样品进行及时、准确的记录和标记，采样人应清晰填写采样单（包括采样人、采样地点、时间、样品名称、来源、批号、数量、保存条件等信息）。

4.5 采集样品的贮存和运输

采样后，应将样品在接近原有贮存温度条件下尽快送往实验室检验。运输时应保持样品完整。如不能及时运送，应在接近原有贮存温度条件下贮存。

5 样品检验

5.1 样品处理

5.1.1 实验室接到送检样品后应认真核对登记，确保样品的相关信息完整并符合检验要求。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1.2 实验室应按要求尽快检验。若不能及时检验，应采取必要的措施保持样品的原有状态，防止样品中目标微生物因客观条件的干扰而发生变化。

5.1.3 冷冻食品应在45 ℃以下不超过15 min，或2 ℃～5 ℃不超过18 h解冻后进行检验。

5.2 检验方法的选择

5.2.1 应选择现行有效的国家标准方法。

5.2.2 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定性检验方法时，应以常规培养方法为基准方法。

5.2.3 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定量检验方法时，应以平板计数法为基准方法。

6 生物安全与质量控制

6.1 实验室生物安全要求

应符合GB 19489的规定。

6.2 质量控制

6.2.1 实验室应定期对实验用菌株、培养基、试剂等设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

6.2.2 实验室应对重要的检验设备（特别是自动化检验仪器）设置仪器比对。

6.2.3 实验室应定期对实验人员进行技术考核和人员比对。

7 记录与报告

7.1 记录

检验过程中应即时、准确地记录观察到的现象、结果和数据等信息。

7.2 报告

实验室应按照检验方法中规定的要求，准确、客观地报告每一项检验结果。

8 检验后样品的处理

8.1 检验结果报告后，被检样品方能处理。检出致病菌的样品要经过无害化处理。

8.2 检验结果报告后，剩余样品或同批样品不进行微生物项目的复检。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.2—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

National food safety standard

Food microbiological examination：Aerobic plate count

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 4789.2-2008《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》。

本标准与GB/T 4789.2-2008相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——修改了菌落总数计算公式中的解释；

——修改了培养基和试剂；

——删除了第二法　菌落总数Petrifilm^{TM} 测试片法。

本标准的附录A是规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.2-1984、GB 4789.2-1994、GB/T 4789.2-2003、GB/T 4789.2-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　菌落总数测定

1　范围

本标准规定了食品中菌落总数（Aerobic plate count）的测定方法。

本标准适用于食品中菌落总数的测定。

2　术语和定义

2.1　菌落总数 aerobic plate count

食品检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每g（mL）检样中形成的微生物菌落总数。

3　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

3.1　恒温培养箱：36 ℃±1 ℃，30 ℃±1 ℃。

3.2　冰箱：2 ℃～5 ℃。

3.3　恒温水浴箱：46 ℃±1 ℃。

3.4　天平：感量为 0.1 g。

3.5　均质器。

3.6　振荡器。

3.7　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

3.8　无菌锥形瓶：容量 250 mL、500 mL。

3.9　无菌培养皿：直径 90 mm。

3.10　pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

3.11　放大镜或/和菌落计数器。

4　培养基和试剂

4.1　平板计数琼脂培养基：见附录 A 中 A.1。

4.2　磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.2。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.3 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.3。

5 检验程序

菌落总数的检验程序见图1。

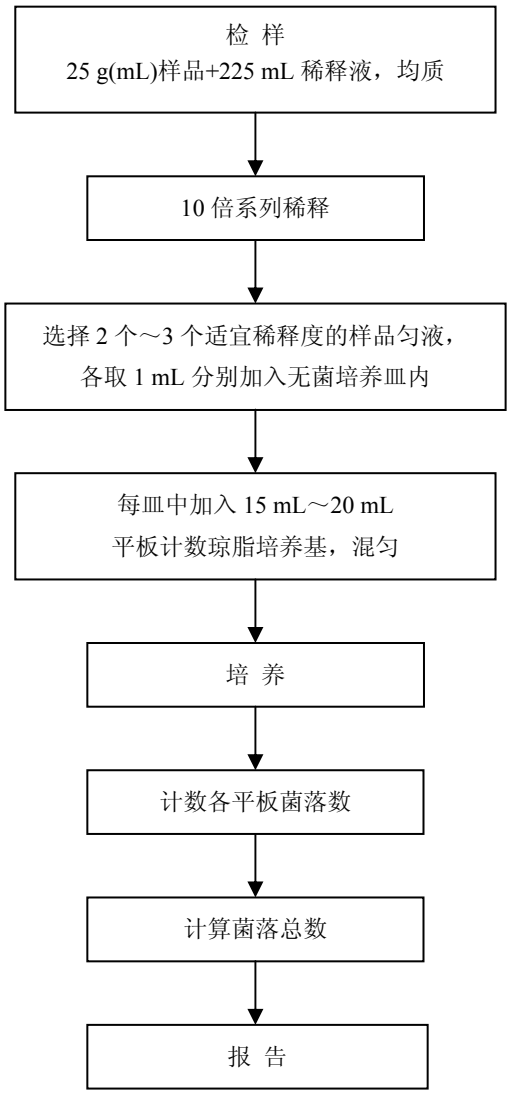


图 1 菌落总数的检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min～10000 r/min 均质 1 min～2 min，或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min～2 min，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

6.1.4 按 6.1.3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

6.1.5 根据对样品污染状况的估计，选择 2 个～3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个平皿。同时，分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。

6.1.6 及时将 15 mL～20 mL 冷却至 46 ℃的平板计数琼脂培养基（可放置于 46 ℃±1 ℃恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

6.2 培养

6.2.1 待琼脂凝固后，将平板翻转，36 ℃±1 ℃培养 48 h±2 h。水产品 30 ℃±1 ℃培养 72 h±3 h。

6.2.2 如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基（约 4 mL），凝固后翻转平板，按 6.2.1 条件进行培养。

6.3 菌落计数

可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units，CFU）表示。

6.3.1 选取菌落数在 30 CFU～300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

6.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。

6.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

7 结果与报告

7.1 菌落总数的计算方法

7.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g（mL）样品中菌落总数结果。

7.1.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按公式（1）计算：

$$N = \sum C \Big/ (n_1 + 0.1 n_2) d \qquad \cdots\cdots (1)$$

式中：

N——样品中菌落数；

$\sum C$——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

n_1——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n_2——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

示例：

稀释度	1:100（第一稀释度）	1:1000（第二稀释度）
菌落数（CFU）	232，244	33，35

$$N = \sum C \Big/ (n_1 + 0.1n_2)d$$

$$= \frac{232 + 244 + 33 + 35}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{544}{0.022} = 24727$$

上述数据按7.2.2数字修约后，表示为25000或2.5×10^4。

7.1.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

7.1.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.1.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.1.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU～300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时，则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.2 菌落总数的报告

7.2.1 菌落数小于 100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

7.2.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

7.2.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

7.2.4 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

7.2.5 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 平板计数琼脂（plate count agar，PCA）培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼　脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.0±0.2

A.1.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH。分装试管或锥形瓶，121 ℃高压灭菌15 min。

A.2 磷酸盐缓冲液

A.2.1 成分

磷酸二氢钾（KH_2PO_4）	34.0 g
蒸馏水	500 mL

pH 7.2

A.2.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 ℃高压灭菌15 min。

A.3 无菌生理盐水

A.3.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 ℃高压灭菌15 min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.3—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

National food safety standard

Food microbiological examination: Enumeration of coliforms

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 4789.3-2008《食品卫生微生物学检验 大肠菌群计数》。

本标准与GB/T 4789.3-2008相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——“第二法　大肠菌群平板计数法”的平板菌落数的选择范围修改为“15 CFU～150 CFU”；

——删除了“第三法　大肠菌群Petrifilm™ 测试片法”。

本标准的附录A、附录B为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.3-1984、GB 4789.3-1994、GB /T 4789.3-2003、GB /T 4789.3-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　大肠菌群计数

1　范围

本标准规定了食品中大肠菌群（Coliforms）计数的方法。

本标准适用于食品中大肠菌群的计数。

2　术语和定义

2.1　大肠菌群 coliforms

在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

2.2　最可能数 most probable number，MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

3　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

3.1　恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

3.2　冰箱：2 ℃～5 ℃。

3.3　恒温水浴箱：46 ℃±1 ℃。

3.4　天平：感量 0.1 g。

3.5　均质器。

3.6　振荡器。

3.7　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

3.8　无菌锥形瓶：容量 500 mL。

3.9　无菌培养皿：直径 90 mm。

3.10　pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

3.11　菌落计数器。

4　培养基和试剂

4.1　月桂基硫酸盐胰蛋白胨（Lauryl Sulfate Tryptose，LST）肉汤：见附录 A 中 A.1。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.2 煌绿乳糖胆盐（Brilliant Green Lactose Bile，BGLB）肉汤：见附录 A 中 A.2。

4.3 结晶紫中性红胆盐琼脂（Violet Red Bile Agar，VRBA）：见附录 A 中 A.3。

4.4 磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.4。

4.5 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.5。

4.6 无菌 1 mol/L NaOH：见附录 A 中 A.6。

4.7 无菌 1 mol/L HCl：见附录 A 中 A.7。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第一法　大肠菌群 MPN 计数法

5　检验程序

大肠菌群MPN计数的检验程序见图1。

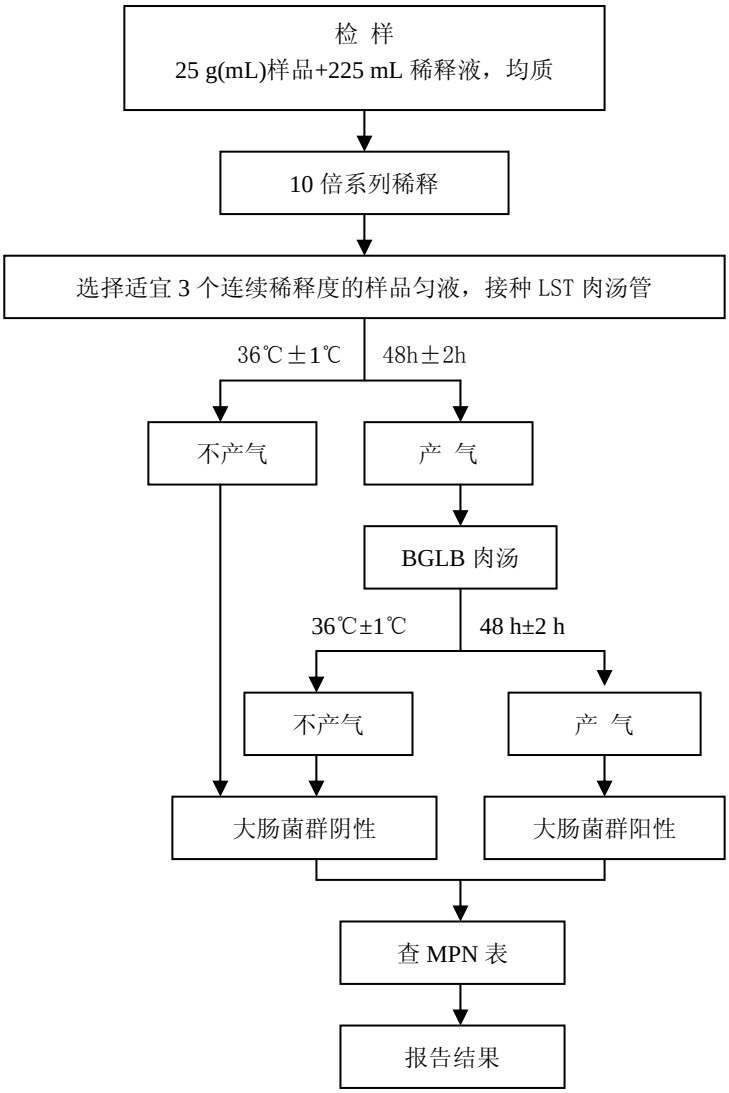


图1　大肠菌群 MPN 计数法检验程序

6　操作步骤

6.1　样品的稀释

6.1.1　固体和半固体样品：称取 25 g 样品,放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8000 r/min～10000 r/min 均质 1 min～2 min,或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min～2 min，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.2　液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.3　样品匀液的 pH 值应在 6.5～7.5 之间，必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.1.4 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓缓注入 9 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

6.1.5 根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 min。

6.2 初发酵试验

每个样品，选择3个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种3管月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤，每管接种1mL（如接种量超过1 mL，则用双料LST肉汤），36 ℃±1 ℃培养24 h±2 h，观察倒管内是否有气泡产生，24 h±2 h产气者进行复发酵试验，如未产气则继续培养至48 h±2 h，产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

6.3 复发酵试验

用接种环从产气的LST肉汤管中分别取培养物1环，移种于煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）管中，36 ℃±1 ℃培养48 h±2 h，观察产气情况。产气者，计为大肠菌群阳性管。

6.4 大肠菌群最可能数（MPN）的报告

按6.3确证的大肠菌群LST阳性管数，检索MPN表（见附录B），报告每g（mL）样品中大肠菌群的MPN值。

第二法 大肠菌群平板计数法

7 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序见图2。

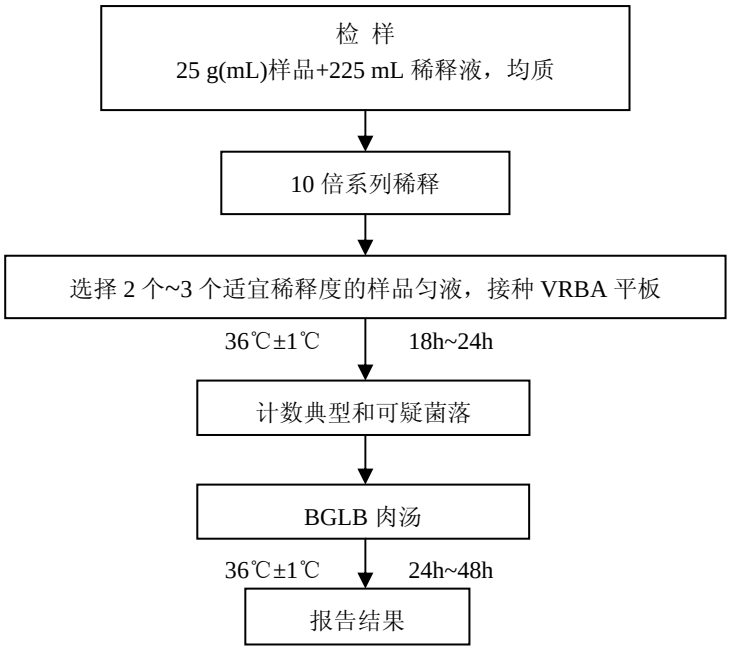


图2 大肠菌群平板计数法检验程序

8 操作步骤

食品伙伴网http://www.foodmate.net

8.1 样品的稀释

按6.1进行。

8.2 平板计数

8.2.1 选取2个～3个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种2个无菌平皿，每皿1 mL。同时取1 mL生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

8.2.2 及时将15 mL～20 mL冷至46 ℃的结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）约倾注于每个平皿中。小心旋转平皿，将培养基与样液充分混匀，待琼脂凝固后，再加3 mL～4 mLVRBA覆盖平板表层。翻转平板，置于36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h。

8.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU～150 CFU 之间的平板，分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色，菌落周围有红色的胆盐沉淀环，菌落直径为 0.5 mm 或更大。

8.4 证实试验

从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落，分别移种于 BGLB 肉汤管内，36 ℃±1 ℃培养 24 h～48 h，观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气，即可报告为大肠菌群阳性。

8.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以8.3中计数的平板菌落数，再乘以稀释倍数，即为每g（mL）样品中大肠菌群数。例：10^{-4}样品稀释液1 mL，在VRBA平板上有100个典型和可疑菌落，挑取其中10个接种BGLB肉汤管，证实有6个阳性管，则该样品的大肠菌群数为：$100\times6/10\times10^{4}$/g（mL）=$6.0\times10^{5}$ CFU/g（mL）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤

A.1.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾（K_2HPO_4）	2.75 g
磷酸二氢钾（KH_2PO_4）	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节 pH。分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10 mL。121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2 煌绿乳糖胆盐（BGLB）肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
牛胆粉（oxgall或oxbile）溶液	200 mL
0.1%煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	800 mL

pH 7.2±0.1

A.2.2 制法

将蛋白胨、乳糖溶于约500 mL蒸馏水中，加入牛胆粉溶液200 mL（将20.0 g脱水牛胆粉溶于200 mL蒸馏水中，调节pH至7.0～7.5），用蒸馏水稀释到975 mL，调节pH，再加入0.1%煌绿水溶液13.3 mL，用蒸馏水补足到1 000 mL，用棉花过滤后，分装到有玻璃小倒管的试管中，每管10 mL。121 ℃高压灭菌15 min。

A.3 结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）

A.3.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
胆盐或3号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g～18 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.1

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.3.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节pH。煮沸2 min，将培养基冷却至45 ℃～50 ℃倾注平板。使用前临时制备，不得超过3 h。

A.4 磷酸盐缓冲液

A.4.1 成分

磷酸二氢钾（KH_2PO_4）	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 7.2	

A.4.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 ℃高压灭菌15 min。

A.5 无菌生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 ℃高压灭菌15 min。

A.6 1 mol/L NaOH

A.6.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1000 mL

A.6.2 制法

称取40 g氢氧化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 ℃高压灭菌15 min。

A.7 1 mol/L HCl

A.7.1 成分

HCl	90 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

移取浓盐酸90 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，121 ℃高压灭菌15 min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录B
（规范性附录）
大肠菌群最可能数（MPN）检索表

B.1 大肠菌群最可能数（MPN）检索表

每g（mL）检样中大肠菌群最可能数（MPN）的检索见表B.1。

表B.1 大肠菌群最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1：本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]，每个稀释度接种 3 管。

注 2：表内所列检样量如改用 l g （mL）、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.4—2010

食品安全国家标准
食品微生物学检验 沙门氏菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: *Salmonella*

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 4789.4-2008《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.4-2008 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中英文名称；

——修改了标准的范围；

——修改了培养基和试剂；

——修改了设备和材料；

——修改了附录 A。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

——GB 4789.4-84、GB 4789.4-1994、GB/T 4789.4-2003、GB/T 4789.4-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　沙门氏菌检验

1　范围

本标准规定了食品中沙门氏菌（*Salmonella*）的检验方法。

本标准适用于食品中沙门氏菌的检验。

2　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1　冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.2　恒温培养箱：36 ℃±1 ℃，42 ℃±1 ℃。

2.3　均质器。

2.4　振荡器。

2.5　电子天平：感量 0.1 g。

2.6　无菌锥形瓶:容量 500 mL，250 mL。

2.7　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

2.8　无菌培养皿：直径 90 mm。

2.9　无菌试管：3 mm×50 mm、10 mm×75 mm。

2.10　无菌毛细管。

2.11　pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

2.12　全自动微生物生化鉴定系统。

3　培养基和试剂

3.1　缓冲蛋白胨水（BPW）：　见附录 A 中 A.1。

3.2　四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液：见附录 A 中 A.2。

3.3　亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液：见附录 A 中 A.3。

3.4　亚硫酸铋（BS）琼脂：见附录 A 中 A.4。

3.5　HE 琼脂：见附录 A 中 A.5。

3.6　木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂：见附录 A 中 A.6。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.7 沙门氏菌属显色培养基。

3.8 三糖铁（TSI）琼脂：见附录 A 中 A.7。

3.9 蛋白胨水、靛基质试剂：见附录 A 中 A.8。

3.10 尿素琼脂（pH 7.2）：见附录 A 中 A.9。

3.11 氰化钾 （KCN） 培养基：见附录 A 中 A.10。

3.12 赖氨酸脱羧酶试验培养基：见附录 A 中 A.11。

3.13 糖发酵管：见附录 A 中 A.12。

3.14 邻硝基酚 β-D 半乳糖苷（ONPG）培养基：见附录 A 中 A.13。

3.15 半固体琼脂：见附录 A 中 A.14。

3.16 丙二酸钠培养基：见附录 A 中 A.15。

3.17 沙门氏菌 O 和 H 诊断血清。

3.18 生化鉴定试剂盒。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

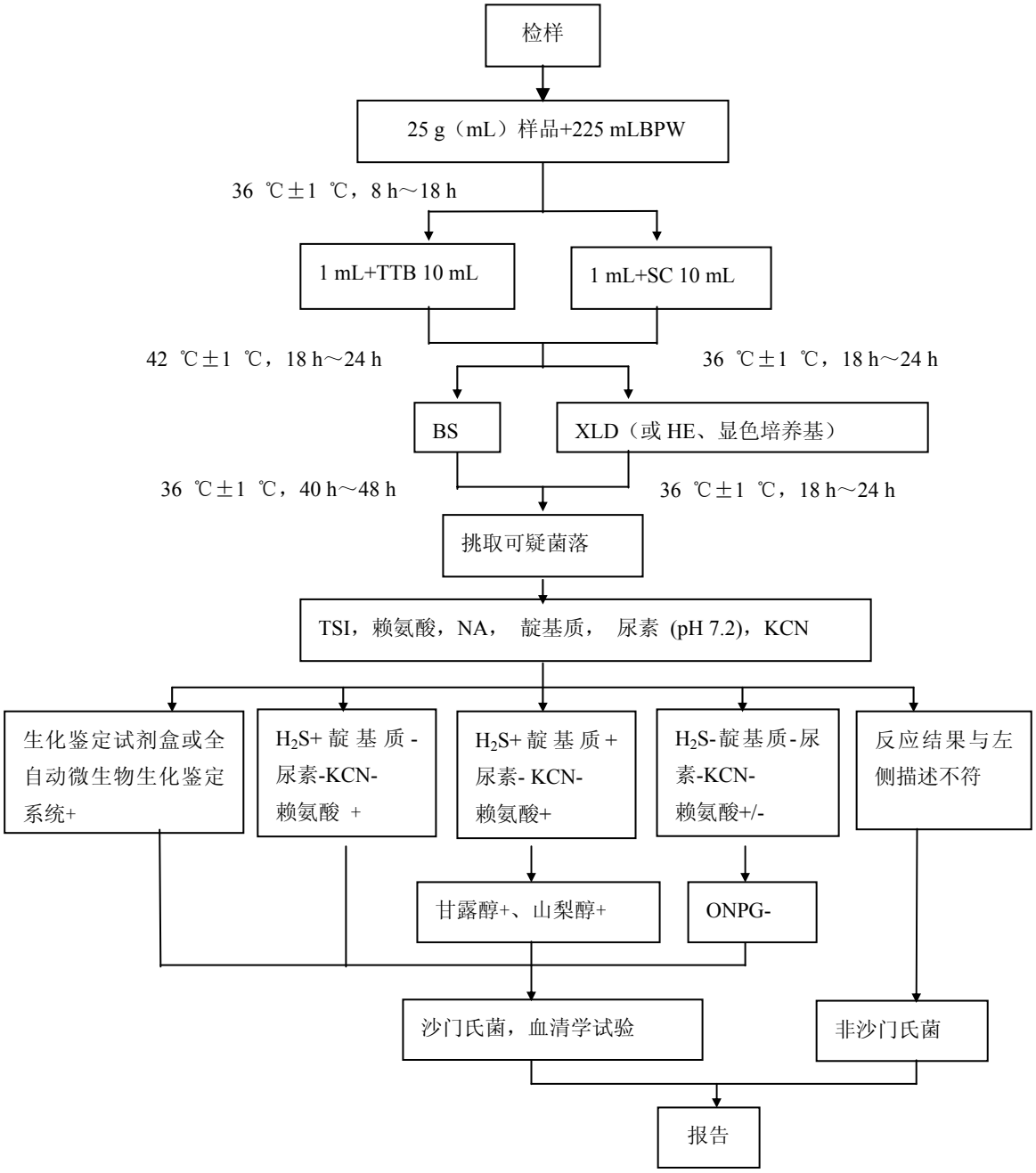


图 1 沙门氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌

称取 25 g（mL）样品放入盛有 225 mL BPW 的无菌均质杯中，以 8 000 r/min～10 000 r/min 均质 1 min～2 min，或置于盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min～2 min。若样品为液态，不需要均质，振荡混匀。如需测定 pH 值，用 1 mol/mL 无菌 NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8±0.2。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

无菌操作将样品转至 500 mL 锥形瓶中，如使用均质袋，可直接进行培养，于 36 ℃±1 ℃培养 8 h～18h。

如为冷冻产品,应在 45 ℃以下不超过 15 min,或 2 ℃～5 ℃不超过 18 h 解冻。

5.2 增菌

轻轻摇动培养过的样品混合物，移取 1 mL，转种于 10 mL TTB 内，于 42 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。同时，另取 1 mL，转种于 10 mL SC 内，于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

5.3 分离

分别用接种环取增菌液 1 环，划线接种于一个 BS 琼脂平板和一个 XLD 琼脂平板（或 HE 琼脂平板或沙门氏菌属显色培养基平板）。于 36 ℃±1 ℃分别培养 18 h～24 h （XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板） 或 40 h～48 h （BS 琼脂平板），观察各个平板上生长的菌落,各个平板上的菌落特征见表 1。

表 1 沙门氏菌属在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	沙门氏菌
BS 琼脂	菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色，菌落周围培养基可呈黑色或棕色；有些菌株形成灰绿色的菌落，周围培养基不变。
HE 琼脂	蓝绿色或蓝色，多数菌落中心黑色或几乎全黑色；有些菌株为黄色，中心黑色或几乎全黑色。
XLD 琼脂	菌落呈粉红色，带或不带黑色中心，有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心，或呈现全部黑色的菌落；有些菌株为黄色菌落，带或不带黑色中心。
沙门氏菌属显色培养基	按照显色培养基的说明进行判定。

5.4 生化试验

5.4.1 自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落，接种三糖铁琼脂，先在斜面划线，再于底层穿刺；接种针不要灭菌,直接接种赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板，于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h，必要时可延长至 48 h。在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内，沙门氏菌属的反应结果见表 2。

表 2 沙门氏菌属在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内的反应结果

三糖铁琼脂				赖氨酸脱羧酶试验培养基	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	＋（－）	＋（－）	＋	可疑沙门氏菌属
K	A	＋（－）	＋（－）	－	可疑沙门氏菌属
A	A	＋（－）	＋（－）	＋	可疑沙门氏菌属
A	A	＋/－	＋/－	－	非沙门氏菌
K	K	＋/－	＋/－	＋/－	非沙门氏菌
注：K：产碱，A：产酸；＋：阳性，－：阴性；＋（－）：多数阳性，少数阴性；＋/－：阳性或阴性。					

5.4.2 接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基的同时,可直接接种蛋白胨水 （供做靛基质试验）、尿素琼脂 （pH7.2）、氰化钾 （KCN） 培养基，也可在初步判断结果后从营养琼脂平板上挑取可疑菌落接种。于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h，必要时可延长至 48 h，按表 3 判定结果。将已挑菌落的平板储存于 2 ℃～5 ℃或室温至少保留 24 h，以备必要时复查。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 3　沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

反应序号	硫化氢（H_2S）	靛基质	pH 7.2 尿素	氰化钾（KCN）	赖氨酸脱羧酶
A1	＋	－	－	－	＋
A2	＋	＋	－	－	＋
A3	－	－	－	－	＋/－
注：＋阳性；－阴性；＋/－阳性或阴性。					

5.4.2.1　反应序号 A1：典型反应判定为沙门氏菌属。如尿素、KCN 和赖氨酸脱羧酶 3 项中有 1 项异常，按表 4 可判定为沙门氏菌。 如有 2 项异常为非沙门氏菌。

表 4　沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

pH 7.2 尿素	氰化钾（KCN）	赖氨酸脱羧酶	判　定　结　果
－	－	－	甲型副伤寒沙门氏菌（要求血清学鉴定结果）
－	＋	＋	沙门氏菌Ⅳ或Ⅴ（要求符合本群生化特性）
＋	－	＋	沙门氏菌个别变体（要求血清学鉴定结果）
注：＋表示阳性；＋表示阴性。			

5.4.2.2　反应序号 A2：补做甘露醇和山梨醇试验，沙门氏菌靛基质阳性变体两项试验结果均为阳性，但需要结合血清学鉴定结果进行判定。

5.4.2.3　反应序号 A3：补做 ONPG。ONPG 阴性为沙门氏菌，同时赖氨酸脱羧酶阳性,甲型副伤寒沙门氏菌为赖氨酸脱羧酶阴性。

5.4.2.4　必要时按表 5 进行沙门氏菌生化群的鉴别。

表 5　沙门氏菌属各生化群的鉴别

项　目	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ
卫矛醇	＋	＋	－	－	＋	－
山梨醇	＋	＋	＋	＋	＋	－
水杨苷	－	－	－	＋	－	－
ONPG	－	－	＋	－	＋	－
丙二酸盐	－	＋	＋	－	－	－
KCN	－	－	－	＋	＋	－
注：＋表示阳性；－表示阴性。						

5.4.3　如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统，可根据 5.4.1 的初步判断结果，从营养琼脂平板上挑取可疑菌落，用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液，使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

5.5　血清学鉴定

5.5.1　抗原的准备

一般采用 1.2%～1.5%琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

O 血清不凝集时，将菌株接种在琼脂量较高的 （如 2%～3%） 培养基上再检查；如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时，可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液，于酒精灯火焰

食品伙伴网http://www.foodmate.net

上煮沸后再检查。H 抗原发育不良时，将菌株接种在 0.55%～0.65%半固体琼脂平板的中央，俟菌落蔓延生长时，在其边缘部分取菌检查；或将菌株通过装有 0.3%～0.4%半固体琼脂的小玻管 1 次～2 次，自远端取菌培养后再检查。

5.5.2 多价菌体抗原（O）鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm×2 cm 的区域，挑取 1 环待测菌，各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部，在其中一个区域下部加 1 滴多价菌体（O）抗血清，在另一区域下部加入 1 滴生理盐水，作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min，并对着黑暗背景进行观察，任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

5.5.3 多价鞭毛抗原（H）鉴定

同 5.5.2。

5.5.4 血清学分型（选做项目）

5.5.4.1 O 抗原的鉴定

用 A～F 多价 O 血清做玻片凝集试验，同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙形菌株，不能分型。

被 A～F 多价 O 血清凝集者，依次用 O4；O3、O10；O7；O8；O9；O2 和 O11 因子血清做凝集试验。根据试验结果，判定 O 群。被 O3、O10 血清凝集的菌株，再用 O10、O15、O34、O19 单因子血清做凝集试验，判定 E1、E2、E3、E4 各亚群，每一个 O 抗原成分的最后确定均应根据 O 单因子血清的检查结果，没有 O 单因子血清的要用两个 O 复合因子血清进行核对。

不被 A～F 多价 O 血清凝集者，先用 9 种多价 O 血清检查，如有其中一种血清凝集，则用这种血清所包括的 O 群血清逐一检查，以确定 O 群。每种多价 O 血清所包括的 O 因子如下：

O 多价 1　A，B，C，D，E，F，群 （并包括 6, 14 群）

O 多价 2　13，16，17，18，21 群

O 多价 3　28，30，35，38，39 群

O 多价 4　40，41，42，43 群

O 多价 5　44，45，47，48 群

O 多价 6　50，51，52，53 群

O 多价 7　55，56，57，58 群

O 多价 8　59，60，61，62 群

O 多价 9　63，65，66，67 群

5.5.4.2 H 抗原的鉴定

属于 A～F 各 O 群的常见菌型，依次用表 6 所述 H 因子血清检查第 1 相和第 2 相的 H 抗原。

表 6　A～F 群常见菌型 H 抗原表

O 群	第 1 相	第 2 相
A	a	无
B	g,f,s	无
B	i,b,d	2
C1	k,v,r,c	5,z15
C2	b,d,r	2,5
D（ 不产气的）	d	无
D（产气的）	g,m,p,q	无
E1	h,v	6,w,x
E4	g,s,t	无
E4	i	

食品伙伴网http://www.foodmate.net

不常见的菌型，先用 8 种多价 H 血清检查，如有其中一种或两种血清凝集，则再用这一种或两种血清所包括的各种 H 因子血清逐一检查，以第 1 相和第 2 项的 H 抗原。8 种多价 H 血清所包括的 H 因子如下：

H 多价 1　a，b，c，d，i

H 多价 2　eh，enx，enz_{15}，fg，gms，gpu，gp，gq，mt，gz_{51}

H 多价 3　k，r，y，z，z_{10}，lv，lw，lz_{13}，lz_{28}，lz_{40}

H 多价 4　1,2；1,5；1,6；1,7；z_6

H 多价 5　z_4z_{23}，z_4z_{24}，z_4z_{32}，z_{29}，z_{35}，z_{36}，z_{38}

H 多价 6　z_{39}，z_{41}，z_{42}，z_{44}

H 多价 7　z_{52}，z_{53}，z_{54}，z_{55}

H 多价 8　z_{56}，z_{57}，z_{60}，z_{61}，z_{62}

每一个 H 抗原成分的最后确定均应根据 H 单因子血清的检查结果，没有 H 单因子血清的要用两个 H 复合因子血清进行核对。

检出第 1 相 H 抗原而未检出第 2 相 H 抗原的或检出第 2 相 H 抗原而未检出第 1 相 H 抗原的,可在琼脂斜面上移种 1～2 代后再检查。如仍只检出一个相的 H 抗原，要用位相变异的方法检查其另一个相。单相菌不必做位相变异检查。

位相变异试验方法如下：

小玻管法： 将半固体管（每管约 1 mL～2 mL） 在酒精灯上溶化并冷至 50 ℃，取已知相的 H 因子血清 0.05 mL～0.1 mL，加入于溶化的半固体内，混匀后，用毛细吸管吸取分装于供位相变异试验的小玻管内，俟凝固后，用接种针挑取待检菌，接种于一端。将小玻管平放在平皿内，并在其旁放一团湿棉花，以防琼脂中水分蒸发而干缩，每天检查结果，待另一相细菌解离后，可以从另一端挑取细菌进行检查。培养基内血清的浓度应有适当的比例，过高时细菌不能生长，过低时同一相细菌的动力不能抑制。一般按原血清 1：200～1：800 的量加入。

小倒管法：将两端开口的小玻管 （下端开口要留一个缺口，不要平齐） 放在半固体管内,小玻管的上端应高出于培养基的表面，灭菌后备用。临用时在酒精灯上加热溶化，冷至 50 ℃，挑取因子血清 1 环，加入小套管中的半固体内，略加搅动，使其混匀，俟凝固后，将待检菌株接种于小套管中的半固体表层内，每天检查结果，待另一相细菌解离后，可从套管外的半固体表面取菌检查，或转种 1%软琼脂斜面，于 37 ℃培养后再做凝集试验。

简易平板法：将 0.35%～0.4%半固体琼脂平板烘干表面水分，挑取因子血清 1 环，滴在半固体平板表面，放置片刻，待血清吸收到琼脂内，在血清部位的中央点种待检菌株，培养后，在形成蔓延生长的菌苔边缘取菌检查。

5.5.4.3　Vi 抗原的鉴定

用 Vi 因子血清检查。已知具有 Vi 抗原的菌型有：伤寒沙门氏菌，丙型副伤寒沙门氏菌,都柏林沙门氏菌。

5.5.4.4　菌型的判定

根据血清学分型鉴定的结果，按照附录 B 或有关沙门氏菌属抗原表判定菌型。

6　结果与报告

综合以上生化试验和血清学鉴定的结果，报告25 g（mL）样品中检出或未检出沙门氏菌。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水（BPW）

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2±0.2

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅混均匀，静置约 10 min，煮沸溶解，调节 pH，高压灭菌 121 ℃，15 min。

A.2 四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液

A.2.1 基础液

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	3.0 g
碳酸钙	45.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

除碳酸钙外，将各成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，再加入碳酸钙，调节 pH，高压灭菌 121 ℃，20 min。

A.2.2 硫代硫酸钠溶液

硫代硫酸钠（含 5 个结晶水）	50.0 g
蒸馏水	加至 100 mL

高压灭菌 121 ℃，20 min。

A.2.3 碘溶液

碘 片	20.0 g
碘化钾	25.0 g
蒸馏水	加至 100 mL

将碘化钾充分溶解于少量的蒸馏水中，再投入碘片，振摇玻瓶至碘片全部溶解为止，然后加蒸馏水至规定的总量，贮存于棕色瓶内，塞紧瓶盖备用。

A.2.4 0.5%煌绿水溶液

煌绿	0.5 g
蒸馏水	100 mL

溶解后，存放暗处，不少于 1d，使其自然灭菌。

A.2.5 牛胆盐溶液

牛胆盐	10.0 g

食品伙伴网http://www.foodmate.net

蒸馏水	100 mL

加热煮沸至完全溶解，高压灭菌 121 ℃，20 min。

A.2.6 制法

基础液	900 mL
硫代硫酸钠溶液	100 mL
碘溶液	20.0 mL
煌绿水溶液	2.0 mL
牛胆盐溶液	50.0 mL

临用前，按上列顺序，以无菌操作依次加入基础液中，每加入一种成分，均应摇匀后再加入另一种成分。

A.3 亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液

A.3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
磷酸氢二钠	10.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
L-胱氨酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

A.3.2 制法

除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸外，将各成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，冷至 55 ℃以下，以无菌操作加入亚硒酸氢钠和 1 g/L L-胱氨酸溶液 10 mL（称取 0.1 g L-胱氨酸，加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 15 mL，使溶解，再加无菌蒸馏水至 100 mL 即成，如为 DL-胱氨酸，用量应加倍）。摇匀，调节 pH。

A.4 亚硫酸铋（BS）琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
硫酸亚铁	0.3 g
磷酸氢二钠	4.0 g
煌 绿	0.025 g 或 5.0g / L 水溶液 5.0mL
柠檬酸铋铵	2.0 g
亚硫酸钠	6.0 g
琼 脂	18.0 g～20 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.5±0.2

A.4.2 制法

将前三种成分加入 300 mL 蒸馏水（制作基础液），硫酸亚铁和磷酸氢二钠分别加入 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中，柠檬酸铋铵和亚硫酸钠分别加入另一 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中，琼脂加入 600 mL 蒸馏水中。然后分别搅拌均匀，煮沸溶解。冷至 80 ℃左右时，先将硫酸亚铁和磷酸氢二钠混匀，倒入基础液中，混匀。将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠混匀，倒入基础液中，再混匀。调节 pH，随即倾入琼脂液中，混合均匀，冷至 50 ℃～55 ℃。加入煌绿溶液，充分混匀后立即倾注平皿。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

注：本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处，超过 48 h 会降低其选择性，本培养基宜于当天制备，第二天使用。

A.5 HE 琼脂（Hektoen Enteric Agar）

A.5.1 成分

蛋白胨	12.0 g
牛肉膏	3.0 g
乳糖	12.0 g
蔗糖	12.0 g
水杨素	2 .0 g
胆盐	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	18.0 g～20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
0.4％溴麝香草酚蓝溶液	16.0 mL
Andrade 指示剂	20.0 mL
甲液	20.0 mL
乙液	20.0 mL
pH 7.5±0.2	

A.5.2 制法

将前面七种成分溶解于 400 mL 蒸馏水内作为基础液;将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水内。然后分别搅拌均匀，煮沸溶解。加入甲液和乙液于基础液内,调节 pH。再加入指示剂,并与琼脂液合并,待冷至 50 ℃～55 ℃倾注平皿。

注:①本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性。

②甲液的配制

硫代硫酸钠	34.0 g
柠檬酸铁铵	4.0 g
蒸馏水	100 mL

③乙液的配制

去氧胆酸钠	10.0 g
蒸馏水	100 mL

④ Andrade 指示剂

酸性复红	0.5 g
1mol/L 氢氧化钠溶液	16.0 mL
蒸馏水	100 mL

将复红溶解于蒸馏水中,加入氢氧化钠溶液。数小时后如复红褪色不全,再加氢氧化钠溶液 1 mL～2 mL。

A.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂

A.6.1 成分

酵母膏	3.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g

食品伙伴网http://www.foodmate.net

蔗糖	7.5 g
去氧胆酸钠	2.5 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
硫代硫酸钠	6.8 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
酚红	0.08 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.2

A.6.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，待冷至 50 ℃～55 ℃倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处。本培养基宜于当天制备，第二天使用。

A.7 三糖铁（TSI）琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
乳 糖	10.0 g
蔗 糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵(含 6 个结晶水)	0.2 g
酚 红	0.025 g 或 5.0 g/L 溶液 5.0 mL
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼 脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.2

A.7.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，混匀，分装试管，每管约 2 mL～4 mL，高压灭菌 121 ℃ 10 min 或 115 ℃ 15 min，灭菌后置成高层斜面，呈桔红色。

A.8 蛋白胨水、靛基质试剂

A.8.1 蛋白胨水

蛋白胨（或胰蛋白胨）	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.2

将上述成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH，分装小试管,121 ℃高压灭菌 15 min。

A.8.2 靛基质试剂

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.8.2.1 柯凡克试剂：将 5 g 对二甲氨基甲醛溶解于 75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

A.8.2.2 欧-波试剂：将 1 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95 mL95％乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

A.8.3 试验方法

挑取小量培养物接种,在 36 ℃±1 ℃培养 1 d～2 d，必要时可培养 4 d～5 d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL，轻摇试管,阳性者于试剂层呈深红色；或加入欧-波试剂约 0.5 mL，沿管壁流下，覆盖于培养液表面,阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注：蛋白胨中应含有丰富的色氯酸。每批蛋白胨买来后，应先用已知菌种鉴定后方可使用。

A.9 尿素琼脂（pH 7.2）

A.9.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4％酚 红	3.0 mL
琼 脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
20%尿素溶液	100 mL
pH7.2±0.2	

A.9.2 制法

除尿素、琼脂和酚红外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂后分装，121 ℃高压灭菌 15 min。冷至 50 ℃～55 ℃,加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为 2％。分装于无菌试管内，放成斜面备用。

A.9.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种,在 36 ℃±1 ℃培养 24 h，观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A.10 氰化钾 （KCN） 培养基

A.10.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
蒸馏水	1 000 mL
0.5％氰化钾	20.0 mL

A.10.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5％氰化钾溶液 2.0 mL（最后浓度为 1:10 000），分装于无菌试管内,每管约 4 mL,立刻用无菌橡皮塞塞紧,放在 4 ℃冰箱内,至少可保存两个月。同时，将不加氰化钾的培养基作为对照培养基,分装试管备用。

A.10.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液，挑取 1 环接种于氰化钾（KCN）培养基。并另

食品伙伴网http://www.foodmate.net

挑取 1 环接种于对照培养基。在 36 ℃±1 ℃培养 1 d～2 d，观察结果。如有细菌生长即为阳性（不抑制），经 2 d 细菌不生长为阴性（抑制）。

注:氰化钾是剧毒药,使用时应小心，切勿沾染，以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严,氰化钾逐渐分解，产生氢氰酸气体逸出，以致药物浓度降低，细菌生长，因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

A.11 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-赖氨酸或 DL-赖氨酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL
pH 6.8±0.2	

A.11.2 制法

除赖氨酸以外的成分加热溶解后,分装每瓶 100 mL，分别加入赖氨酸。L-赖氨酸按 0.5%加入，DL-赖氨酸按 1%加入。调节 pH。对照培养基不加赖氨酸。分装于无菌的小试管内，每管 0.5 mL，上面滴加一层液体石蜡，115 ℃高压灭菌 10 min。

A.11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h，观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱，培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

A.12 糖发酵管

A.12.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	2.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	

A.12.2 制法

A.12.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后，调节 pH。按 0.5%加入葡萄糖，分装于有一个倒置小管的小试管内，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.12.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10%溶液，同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内，以无菌操作分装小试管。

注：蔗糖不纯,加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A.12.3 试验方法:从琼脂斜面上挑取小量培养物接种，于 36 ℃±1 ℃培养,一般 2 d～3 d。迟缓反应需观察 14 d～30 d。

A.13 ONPG 培养基

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.13.1 成分

邻硝基酚 β-D 半乳糖苷（ONPG）（O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside）	60.0 mg
0.01mol/L 磷酸钠缓冲液（pH7.5）	10.0 mL
1%蛋白胨水（pH7.5）	30.0 mL

A.13.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内，加入蛋白胨水，以过滤法除菌，分装于无菌的小试管内，每管 0.5 mL，用橡皮塞塞紧。

A.13.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 1 满环接种于 36 ℃±1 ℃培养 1 h～3 h 和 24 h 观察结果。如果 β-半乳糖苷酶产生，则于 1 h～3 h 变黄色，如无此酶则 24 h 不变色。

A.14 半固体琼脂

A.14.1 成分

牛肉膏	0.3 g
蛋白胨	1.0 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35g～0.4 g
蒸馏水	100 mL
pH 7.4±0.2	

A.14.2 制法

按以上成分配好,煮沸溶解,调节 pH。分装小试管。121 ℃高压灭菌 15 min。直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

A.15 丙二酸钠培养基

A.15.1 成分

酵母浸膏	1.0 g
硫酸铵	2.0 g
磷酸氢二钾	0.6 g
磷酸二氢钾	0.4 g
氯化钠	2.0 g
丙二酸钠	3.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.15.2 制法

除指示剂以外的成分溶解于水，调节 pH，再加入指示剂，分装试管，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.15.3 试验方法

用新鲜的琼脂培养物接种，于36 ℃±1 ℃培养48 h，观察结果。阳性者由绿色变为蓝色。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（规范性附录）
常见沙门氏菌抗原

B.1 常见沙门氏菌抗原

常见沙门氏菌抗原见表 B.1。

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表

菌　　名	拉丁菌名	O 抗　原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
A　　群				
甲型副伤寒沙门氏菌	*S. paratyphi A*	1，2，12	a	[1,5]
B　　群				
基桑加尼沙门氏菌	*S .kisangani*	1,4,[5],12	a	1,2
阿雷查瓦莱塔沙门氏菌	*S. arechavaleta*	4,[5],12	a	1,7
马流产沙门氏菌	*S. abortusequi*	4,12	-	e,n,x,
乙型副伤寒沙门氏菌	*S. paratyphi B*	1,4,[5],12	b	1,2
利密特沙门氏菌	*S. limete*	1,4,12,[27]	b	1,5
阿邦尼沙门氏菌	*S. abony*	1,4,[5],12,27	b	e,n,x
维也钠沙门氏菌	*S. wien*	1,4,12,[27]	b	l,w
伯里沙门氏菌	*S .bury*	4,12,[27]	c	z6
斯坦利沙门氏菌	*S. stanley*	1,4,[5],12,[27]	d	1,2
圣保罗沙门氏菌	*S. saintpaul*	1,4,[5],12	e,h	1,2
里定沙门氏菌	*S .reading*	1,4,[5],12	e,h	1,5
彻斯特沙门氏菌	*S. chester*	1,4,[5],12	e,h	e,n,x
德尔卑沙门氏菌	*S. derby*	1,4,[5],12	f,g	[1,2]
阿贡纳沙门氏菌	*S. agona*	1,4,[5],12	f,g,s	[1,2]
埃森沙门氏菌	*S. essen*	4,12	g,m	-
加利福尼亚沙门氏菌	*S. california*	4,12	g,m,t	[z_{67}]
金斯敦沙门氏菌	*S. kingston*	1,4,[5],12,[27]	g,s,t	[1,2]
布达佩斯沙门氏菌	*S. budapest*	1,4,12,[27]	g,t	-
鼠伤寒沙门氏菌	*S. typhimurium*	1,4,[5],12	i	1,2

食品伙伴网http://www.foodmate.net

拉古什沙门氏菌	*S. Lagos*	1,4,[5],12	i	1,5
布雷登尼沙门氏菌	*S.bredeney*	1,4,12,[27]	l,v	1,7
基尔瓦沙门氏菌Ⅱ	*S.kilwa Ⅱ*	4,12	l,w	e,n,x
海德尔堡沙门氏菌	*S.heidelberg*	1,4,[15],12	r	1,2
印地安纳沙门氏菌	*S.indiana*	1,4,12	z	1,7
斯坦利维尔沙门氏菌	*S.stanleyville*	1,4,[5],12.[27]	z_4,z_{23}	[1,2]
伊图里沙门氏菌	*S.ituri*	1,4,12	z_{10}	1,5
C1 群				
奥斯陆沙门氏菌	*S.oslo*	6,7,14	a	e,n,x
爱丁保沙门氏菌	*S.edinburg*	6,7, 14	b	1,5
布隆方丹沙门氏菌Ⅱ	*S.bloemfontein Ⅱ*	6,7	b	[e,n,x]：z_{42}
丙型副伤寒沙门氏菌	*S.paratyphi C*	6,7,[Vi]	c	1,5
猪霍乱沙门氏菌	*S.choleraesuis*	6,7	c	1,5
猪伤寒沙门氏菌	*S.typhisuis*	6,7	c	1,5
罗米他沙门氏菌	*S.lomita*	6,7	e,h	1,5
布伦登卢普沙门氏菌	*S.braenderup*	6,7, 14	e,h	e,n,z_{15}
里森沙门氏菌	*S.rissen*	6,7, 14	f,g	-
蒙得维的亚沙门氏菌	*S.montevideo*	6,7, 14	g,m,[p],s	[1,2,7]
里吉尔沙门氏菌	*S.*riggil	6,7	g,[t]	-
奥雷宁堡沙门氏菌	*S.oranieburg*	6,7, 14	m,t	[2,5,7]
奥里塔蔓林沙门氏菌	*S.oritamerin*	6,7	i	1,5
汤卜逊沙门氏菌	*S.thompson*	6,7, 14	k	1,5
康科德沙门氏菌	*S.concord*	6,7	l,v	1,2
伊鲁木沙门氏菌	*S.irumu*	6,7	l,v	1,5
姆卡巴沙门氏菌	*S.mkamba*	6,7	l,v	1,6
波恩沙门氏菌	*S.bonn*	6,7	l,v	e,n,x
波茨坦沙门氏菌	*S.potsdam*	6,7, 14	l,v	e,n,z_{15}
格但斯克沙门氏菌	*S.gdansk*	6,7, 14	l,v	z_6
维尔肖沙门氏菌	*S.virchow*	6,7, 14	r	1,2

食品伙伴网http://www.foodmate.net

婴儿沙门氏菌	*S.infantis*	6,7,14	r	1,5
巴布亚沙门氏菌	*S.papuana*	6,7	r	e,n,z_{15}
巴累利沙门氏菌	*S.bareilly*	6,7,14	y	1,5
哈特福德沙门氏菌	*S.hartford*	6,7	y	e,n,x
三河岛沙门氏菌	*S.mikawasima*	6,7,14	y	e,n,z_{15}
姆班达卡沙门氏菌	*S.mbandaka*	6,7,14	z_{10}	e,n,z_{15}
田纳西沙门氏菌	*S.tennessee*	6,7,14	z_{29}	[1,2,7]
布伦登卢普沙门氏菌	*S.braenderup*	6,7,14	e,h	e,n,z_{15}
耶路撒冷沙门氏菌	*S.jerusalem*	6,7,14	z_{10}	l,w
C2 群				
习志野沙门氏菌	*S.narashino*	6.8	a	e,n,x
名古屋沙门氏菌	*S.nagoya*	6,8	b	1,5
加瓦尼沙门氏菌	*S.gatuni*	6,8	b	e,n,x
慕尼黑沙门氏菌	*S.muenchen*	6,8	d	1,2
蔓哈顿沙门氏菌	*S.manhattan*	6,8	d	1,5
纽波特沙门氏菌	*S.newport*	6,8,20	e,h	1,2
科特布斯沙门氏菌	*S.kottbus*	6,8	e,h	1,5
茨昂威沙门氏菌	*S.tshiongwe*	6,8	e,h	e,n,z_{15}
林登堡沙门氏菌	*S.lindenburg*	6,8	i	1,2
塔科拉迪沙门氏菌	*S.takoradi*	6,8	i	1,5
波那雷恩沙门氏菌	*S.bonariensis*	6,8	i	e,n,x
利齐菲尔德沙门氏菌	*S.litchfield*	6,8	l,v	1,2
病牛沙门氏菌	*S.bovismorbificans*	6,8,20	r,[i]	1,5
查理沙门氏菌	*S.chailey*	6,8	z_4,z_{23}	e,n,z_{15}
C3 群				
巴尔多沙门氏菌	*S.bardo*	8	e,h	1,2
依麦克沙门氏菌	*S.emek*	8,20	g,m,s	-
肯塔基沙门氏菌	*S.kentucky*	8,20	i	z_6

食品伙伴网http://www.foodmate.net

D 群				
仙台沙门氏菌	*S.sendai*	1,9,12	a	1,5
伤寒沙门氏菌	*S.typhi*	9,12,[Vi]	d	-
塔西沙门氏菌	*S.tarshyne*	9,12	d	1,6
伊斯特本沙门氏菌	*S.eastbourne*	1,9,12	e,h	1,5
以色列沙门氏菌	*S.israel*	9,12	e,h	e,n,z_{15}
肠炎沙门氏菌	*S.enteritidis*	1,9,12	g,m	[1,7]
布利丹沙门氏菌	*S.blegdam*	9,12	g,m,q	-
沙门氏菌 II	*Salmonella II*	1,9,12	g,m,[s],t	[1,5,7]
都柏林沙门氏菌	*S.dublin*	1,9,12,[Vi]	g,p	-
芙蓉沙门氏菌	*S.seremban*	9,12	i	1,5
巴拿马沙门氏菌	*S.panama*	1,9,12	l,v	1,5
戈丁根沙门氏菌	*S.goettingen*	9,12	l,v	e,n,z_{15}
爪哇安纳沙门氏菌	*S.javiana*	1,9,12	L,z_{28}	1,5
鸡-雏沙门氏菌	*S.gallinarum-pullorum*	1,9,12	-	-
E1 群				
奥凯福科沙门氏菌	*S.okefoko*	3,10	c	z_6
瓦伊勒沙门氏菌	*S.vejle*	3,{10}，{15}	e,h	1,2
明斯特沙门氏菌	*S.muenster*	3,{10}{15}{15,34}	e,h	1，5
鸭沙门氏菌	S.anatum	3, {10}{15}{15,34}	e,h	1,6
纽兰沙门氏菌	*S.newlands*	3,{10}，{15,34}	e,h	e,n,x
火鸡沙门氏菌	*S.meleagridis*	3, {10}{15}{15,34}	e,h	l,w
雷根特沙门氏菌	*S.regent*	3,10	f,g,[s]	[1,6]
西翰普顿沙门氏菌	*S.westhampton*	3,{10}{15}{15,34}	g,s,t	-
阿姆德尔尼斯沙门氏菌	*S.amounderness*	3,10	i	1,5
新罗歇尔沙门氏菌	*S.new-rochelle*	3,10	k	l,w
恩昌加沙门氏菌	*S.nchanga*	3,{10}{15}	l,v	1,2
新斯托夫沙门氏菌	*S.sinstorf*	3,10	l,v	1,5

食品伙伴网http://www.foodmate.net

伦敦沙门氏菌	*S.london*	3,{10}{15}	l,v	1,6
吉韦沙门氏菌	*S.give*	3,{10}{15}{15,34}	l,v	1,7
鲁齐齐沙门氏菌	*S.ruzizi*	3,10	l,v	e,n,z_{15}
乌干达沙门氏菌	*S.uganda*	3,{10}{15}	l,z_{13}	1,5
乌盖利沙门氏菌	*S.ughelli*	3,10	r	1,5
韦太夫雷登沙门氏菌	*S.weltevreden*	3,{10}{15}	r	z_6
克勒肯威尔沙门氏菌	*S.clerkenwell*	3,10	z	l,w
列克星敦沙门氏菌	*S.lexington*	3,{10}{15}{15,34}	z_{10}	1,5
E4 群				
萨奥沙门氏菌	*S.sao*	1,3,19	e,h	e,n,z_{15}
卡拉巴尔沙门氏菌	*S.calabar*	1,3,19	e,h	l,w
山夫登堡沙门氏菌	*S.senftenberg*	1,3,19	g,[s],t	-
斯特拉特福沙门氏菌	*S.stratford*	1,3,19	i	1,2
塔克松尼沙门氏菌	*S.taksony*	1,3,19	i	z_6
索恩保沙门氏菌	*S.schoeneberg*	1,3,19	z	e,n,z_{15}
F 群				
昌丹斯沙门氏菌	S.*chandans*	11	d	[e,n,x]
阿柏丁沙门氏菌	*S.aberdeen*	11	i	1,2
布里赫姆沙门氏菌	*S.brijbhumi*	11	i	1,5
威尼斯沙门氏菌	*S.veneziana*	11	i	e,n,x
阿巴特图巴沙门氏菌	*S.abaetetuba*	11	k	1,5
鲁比斯劳沙门氏菌	*S.rubislaw*	11	r	e,n,x
其 他 群				
浦那沙门氏菌	*S.poona*	1,13,22	z	1,6
里特沙门氏菌	*S.ried*	1,13,22	z_4,z_{23}	[e,n,z_{15}]
密西西比沙门氏菌	*S.mississippi*	1,13,23	b	1,5
古巴沙门氏菌	*S.cubana*	1,13,23	z_{29}	-
苏拉特沙门氏菌	*S.surat*	[1],6,14,[25]	r,[i]	e,n,z_{15}

食品伙伴网http://www.foodmate.net

松兹瓦尔沙门氏菌	*S.sundsvall*	[1],6,14,[25]	z	e,n,x
非丁伏斯沙门氏菌	*S.hvittingfoss*	16	b	e,n,x
威斯敦沙门氏菌	*S.weston*	16	e,h	z_6
上海沙门氏菌	*S.*shanghai	16	l,v	1,6
自贡沙门氏菌	*S.zigong*	16	l,w	1,5
巴圭达沙门氏菌	*S.baguida*	21	z_4,z_{23}	-
迪尤波尔沙门氏菌	*S.dieuoppeul*	28	i	1,7
卢肯瓦尔德沙门氏菌	*S.luckenwalde*	28	z_{10}	e,n,z_{15}
拉马特根沙门氏菌	*S.ramatgan*	30	k	1,5
阿德莱沙门氏菌	*S.adelaide*	35	f,g	-
旺兹沃思沙门氏菌	*S.wandsworth*	39	b	1,2
雷俄格伦德沙门氏菌	*S.riogrande*	40	b	1,5
莱瑟沙门氏菌	*S.lethe* *II*	41	g,t	-
达莱姆沙门氏菌	*S.dahlem*	48	k	e,n,z_{15}
沙门氏菌 IIIb	*Salmonella IIIb*	61	l,v	1,5,7

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.3—2010

食品安全国家标准
食品中水分的测定

National food safety standard

Determination of moisture in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5009.3-2003《食品中水分的测定》和GB/T 14769-1993《食品中水分的测定方法》。

本标准与GB/T 5009.3-2003相比主要修改如下：

——增加了卡尔费休法作为“第四法”；

——对直接干燥法中的温度范围进行了修改；

——明确了第一法和第二法公式中的单位；

——对减压干燥法的适用范围进行了修改。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5009.3-1985、GB/T 5009.3-2003；

——GB/T 14769-1993。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中水分的测定

1 范围

本标准规定了食品中水分的测定方法。

本标准中直接干燥法适用于在101 ℃～105 ℃下，不含或含其他挥发性物质甚微的谷物及其制品、水产品、豆制品、乳制品、肉制品及卤菜制品等食品中水分的测定，不适用于水分含量小于0.5 g/100 g的样品。

减压干燥法适用于糖、味精等易分解的食品中水分的测定，不适用于添加了其它原料的糖果，如奶糖、软糖等试样测定，同时该法不适用于水分含量小于0.5 g/100 g的样品。

蒸馏法适用于含较多挥发性物质的食品如油脂、香辛料等水分的测定，不适用于水分含量小于 1 g/100 g的样品。

卡尔•费休法适用于食品中水分的测定，卡尔•费休容量法适用于水分含量大于1.0×10^{-3} g/100 g的样品，卡尔•费休库伦法适用于水分含量大于1.0×10^{-5} g/100 g的样品。

第一法 直接干燥法

2 原理

利用食品中水分的物理性质，在101.3 kPa（一个大气压），温度101 ℃～105 ℃下采用挥发方法测定样品中干燥减失的重量，包括吸湿水、部分结晶水和该条件下能挥发的物质，再通过干燥前后的称量数值计算出水分的含量。

3 试剂和材料

除非另有规定，本方法中所用试剂均为分析纯。

3.1 盐酸：优级纯。

3.2 氢氧化钠（NaOH）：优级纯。

3.3 盐酸溶液（6 mol/L）：量取50 mL盐酸，加水稀释至100 mL。

3.4 氢氧化钠溶液（6mol/L）：称取24 g氢氧化钠，加水溶解并稀释至100 mL。

3.5 海砂：取用水洗去泥土的海砂或河砂，先用盐酸（3.3）煮沸0.5 h，用水洗至中性，再用氢氧化钠溶液（3.4）煮沸0.5 h，用水洗至中性，经105 ℃干燥备用。

4 仪器和设备

4.1 扁形铝制或玻璃制称量瓶。

4.2 电热恒温干燥箱。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.3　干燥器：内附有效干燥剂。

4.4　天平：感量为0.1 mg。

5　分析步骤

5.1　固体试样：取洁净铝制或玻璃制的扁形称量瓶，置于101 ℃～105 ℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，加热1.0 h，取出盖好，置干燥器内冷却0.5 h，称量，并重复干燥至前后两次质量差不超过2 mg，即为恒重。将混合均匀的试样迅速磨细至颗粒小于2 mm，不易研磨的样品应尽可能切碎，称取2 g～10 g试样（精确至0.0001 g），放入此称量瓶中，试样厚度不超过5 mm，如为疏松试样，厚度不超过10 mm，加盖，精密称量后，置101 ℃～105 ℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥2 h～4 h后，盖好取出，放入干燥器内冷却0.5 h后称量。然后再放入101 ℃～105 ℃干燥箱中干燥1 h左右，取出，放入干燥器内冷却0.5 h后再称量。并重复以上操作至前后两次质量差不超过2 mg，即为恒重。

注：两次恒重值在最后计算中，取最后一次的称量值。

5.2　半固体或液体试样：取洁净的称量瓶，内加10 g海砂及一根小玻棒，置于101 ℃～105 ℃干燥箱中，干燥1.0 h后取出，放入干燥器内冷却0.5 h后称量，并重复干燥至恒重。然后称取5 g～10 g试样（精确至0.0001 g），置于蒸发皿中，用小玻棒搅匀放在沸水浴上蒸干，并随时搅拌，擦去皿底的水滴，置101 ℃～105 ℃干燥箱中干燥4 h后盖好取出，放入干燥器内冷却0.5 h后称量。以下按5.1自“然后再放入101 ℃～105 ℃干燥箱中干燥1 h左右……”起依法操作。

6　分析结果的表述

试样中的水分的含量按式（1）进行计算。

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X ——试样中水分的含量，单位为克每百克（g/100g）；

m_1 ——称量瓶(加海砂、玻棒)和试样的质量，单位为克（g）；

m_2 ——称量瓶(加海砂、玻棒)和试样干燥后的质量，单位为克（g）；

m_3 ——称量瓶(加海砂、玻棒)的质量，单位为克（g）。

水分含量≥1 g/100 g时，计算结果保留三位有效数字；水分含量＜1 g/100 g时，结果保留两位有效数字。

7　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5 %。

第二法　减压干燥法

8　原理

利用食品中水分的物理性质，在达到40 kPa～53 kPa压力后加热至60 ℃±5 ℃，采用减压烘干方法去除试样中的水分，再通过烘干前后的称量数值计算出水分的含量。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

9 仪器和设备

9.1 真空干燥箱。

9.2 扁形铝制或玻璃制称量瓶。

9.3 干燥器：内附有效干燥剂。

9.4 天平：感量为0.1 mg。

10 分析步骤

10.1 试样的制备：粉末和结晶试样直接称取；较大块硬糖经研钵粉碎，混匀备用。

10.2 测定：取已恒重的称量瓶称取约2 g～10 g（精确至0.0001 g）试样，放入真空干燥箱内，将真空干燥箱连接真空泵，抽出真空干燥箱内空气（所需压力一般为40 kPa~53 kPa），并同时加热至所需温度60 ℃±5 ℃。关闭真空泵上的活塞，停止抽气，使真空干燥箱内保持一定的温度和压力，经4 h后，打开活塞，使空气经干燥装置缓缓通入至真空干燥箱内，待压力恢复正常后再打开。取出称量瓶，放入干燥器中0.5 h后称量，并重复以上操作至前后两次质量差不超过2 mg，即为恒重。

11 分析结果的表述

同6。

12 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

第三法 蒸馏法

13 原理

利用食品中水分的物理化学性质，使用水分测定器将食品中的水分与甲苯或二甲苯共同蒸出，根据接收的水的体积计算出试样中水分的含量。本方法适用于含较多其他挥发性物质的食品，如油脂、香辛料等。

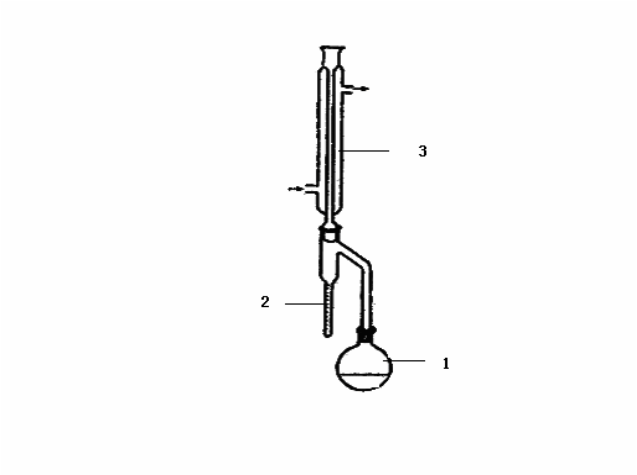
14 试剂和材料

甲苯或二甲苯（化学纯）：取甲苯或二甲苯，先以水饱和后，分去水层，进行蒸馏，收集馏出液备用。

15 仪器和设备

15.1 水分测定器：如图1所示（带可调电热套）。水分接收管容量5 mL，最小刻度值0.1 mL，容量误差小于0.1 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net



1. 250 mL蒸馏瓶； 2. 水分接收管，有刻度； 3. 冷凝管。

图1 水分测定器

15.2 天平：感量为0.1mg。

16 分析步骤

准确称取适量试样（应使最终蒸出的水在2 mL～5 mL，但最多取样量不得超过蒸馏瓶的2/3），放入250 mL锥形瓶中，加入新蒸馏的甲苯(或二甲苯)75 mL，连接冷凝管与水分接收管，从冷凝管顶端注入甲苯，装满水分接收管。

加热慢慢蒸馏，使每秒钟的馏出液为两滴，待大部分水分蒸出后，加速蒸馏约每秒钟4滴，当水分全部蒸出后，接收管内的水分体积不再增加时，从冷凝管顶端加入甲苯冲洗。如冷凝管壁附有水滴，可用附有小橡皮头的铜丝擦下，再蒸馏片刻至接收管上部及冷凝管壁无水滴附着，接收管水平面保持10 min不变为蒸馏终点，读取接收管水层的容积。

17 分析结果的表述

试样中水分的含量按式（2）进行计算。

$$X = \frac{V}{m} \times 100 \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中水分的含量，单位为毫升每百克（mL/100 g）（或按水在20 ℃的密度0.998，20 g/mL计算质量)；

V——接收管内水的体积，单位为毫升（mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

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

18 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第四法　卡尔·费休法

19　原理

根据碘能与水和二氧化硫发生化学反应，在有吡啶和甲醇共存时，1 mol碘只与1 mol水作用，反应式如下：

$C_5H_5N \cdot I_2 + C_5H_5N \cdot SO_2 + C_5H_5N + H_2O + CH_3OH \rightarrow 2C_5H_5N \cdot HI + C_5H_6N[SO_4CH_3]$

卡尔·费休水分测定法又分为库仑法和容量法。库仑法测定的碘是通过化学反应产生的，只要电解液中存在水，所产生的碘就会和水以1:1的关系按照化学反应式进行反应。当所有的水都参与了化学反应，过量的碘就会在电极的阳极区域形成，反应终止。容量法测定的碘是作为滴定剂加入的，滴定剂中碘的浓度是已知的，根据消耗滴定剂的体积，计算消耗碘的量，从而计量出被测物质水的含量。

20　试剂和材料

20.1　卡尔·费休试剂。

20.2　无水甲醇（CH_4O）：优级纯。

21　仪器和设备

21.1　卡尔·费休水分测定仪。

21.2　天平：感量为0.1 mg。

22　分析步骤

22.1　卡尔·费休试剂的标定（容量法）

在反应瓶中加一定体积（浸没铂电极）的甲醇，在搅拌下用卡尔·费休试剂滴定至终点。加入10 mg水（精确至0.0001 g），滴定至终点并记录卡尔·费休试剂的用量（V）。卡尔·费休试剂的滴定度按式（3）计算：

$$T = \frac{M}{V} \qquad \cdots\cdots (3)$$

式中：

T——卡尔·费休试剂的滴定度，单位为毫克每毫升（mg/ mL）；

M——水的质量，单位为毫克（mg）；

V——滴定水消耗的卡尔·费休试剂的用量，单位为毫升（mL）。

22.2　试样前处理

可粉碎的固体试样要尽量粉碎，使之均匀。不易粉碎的试样可切碎。

22.3　试样中水分的测定

于反应瓶中加一定体积的甲醇或卡尔·费休测定仪中规定的溶剂浸没铂电极，在搅拌下用卡尔·费休试剂滴定至终点。迅速将易溶于上述溶剂的试样直接加入滴定杯中；对于不易溶解的试样，应采用对

食品伙伴网http://www.foodmate.net

滴定杯进行加热或加入已测定水分的其他溶剂辅助溶解后用卡尔·费休试剂滴定至终点。建议采用库仑法测定试样中的含水量应大于10 μg，容量法应大于100 μg。对于某些需要较长时间滴定的试样，需要扣除其漂移量。

22.4 漂移量的测定

在滴定杯中加入与测定样品一致的溶剂，并滴定至终点，放置不少于10 min后再滴定至终点，两次滴定之间的单位时间内的体积变化即为漂移量（D）。

23 分析结果的表述

固体试样中水分的含量按式（4），液体试样中水分的含量按式（5）进行计算。

$$X=\frac{(V_1-D\times t)\times T}{M}\times 100 \quad \cdots\cdots (4)$$

$$X=\frac{(V_1-D\times t)\times T}{V_2\rho}\times 100 \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

X ——试样中水分的含量，单位为克每百克（g /100 g）；

V_1——滴定样品时卡尔·费休试剂体积，单位为毫升（mL）；

T ——卡尔·费休试剂的滴定度，单位为克每毫升（g/ mL）；

M ——样品质量，单位为克（g）；

V_2——液体样品体积，单位为毫升（mL）；

D——漂移量，单位为毫升每分钟（mL/min）；

t——滴定时所消耗的时间，单位为分钟（min）；

ρ——液体样品的密度，单位为克每毫升（g/ mL)。

水分含量≥1 g/100 g时，计算结果保留三位有效数字；水分含量<1 g/100 g时，计算结果保留两位有效数字。

24 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.4—2010

食品安全国家标准

食品中灰分的测定

National food safety standard

Determination of ash in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5009.4-2003《食品中灰分的测定》和GB/T 14770-1993《食品中灰分的测定方法》。

本标准与GB/T 5009.4-2003相比主要修改如下：

——本标准不适用淀粉及其衍生物中灰分的测定；

——按照样品不同灰分含量，修改了称样量；

——按照GB/T 14770-1993增加了含磷量较高的豆类及其制品、肉禽制品、蛋制品、水产品、乳及乳制品中灰分的测定；

——修改了计算公式；

——修改了精密度。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5009.4-1985、GB/T 5009.4-2003；

——GB/T 14770-1993。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中灰分的测定

1 范围

本标准规定了食品中灰分的测定方法。

本标准适用于除淀粉及其衍生物之外的食品中灰分含量的测定。

2 原理

食品经灼烧后所残留的无机物质称为灰分。灰分数值系用灼烧、称重后计算得出。

3 试剂和材料

3.1 乙酸镁[（CH_3COO）$_2Mg·4H_2O$）]：分析纯。

3.2 乙酸镁溶液（80 g/L）：称取 8.0 g 乙酸镁（3.1）加水溶解并定容至 100 mL，混匀。

3.3 乙酸镁溶液（240 g/L）：称取 24.0 g 乙酸镁（3.1）加水溶解并定容至 100 mL，混匀。

4 仪器和设备

4.1 马弗炉：温度≥600 ℃。

4.2 天平：感量为 0.1 mg。

4.3 石英坩埚或瓷坩埚。

4.4 干燥器（内有干燥剂）。

4.5 电热板。

4.6 水浴锅。

5 分析步骤

5.1 坩埚的灼烧：取大小适宜的石英坩埚或瓷坩埚置马弗炉中，在 550 ℃±25 ℃下灼烧 0.5 h，冷却至 200 ℃左右，取出，放入干燥器中冷却 30 min，准确称量。重复灼烧至前后两次称量相差不超过 0.5 mg 为恒重。

5.2 称样：灰分大于 10 g/100 g 的试样称取 2 g～3 g（精确至 0.0001 g）；灰分小于 10 g/100 g 的试样称取 3 g～10 g（精确至 0.0001 g）。

5.3 测定

5.3.1 一般食品

液体和半固体试样应先在沸水浴上蒸干。固体或蒸干后的试样，先在电热板上以小火加热使试样充

食品伙伴网http://www.foodmate.net

分炭化至无烟，然后置于马弗炉中，在 550 ℃±25 ℃灼烧 4 h。冷却至 200 ℃左右，取出，放入干燥器中冷却 30 min，称量前如发现灼烧残渣有炭粒时，应向试样中滴入少许水湿润，使结块松散，蒸干水分再次灼烧至无炭粒即表示灰化完全，方可称量。重复灼烧至前后两次称量相差不超过 0.5 mg 为恒重。按式（1）计算。

5.3.2 含磷量较高的豆类及其制品、肉禽制品、蛋制品、水产品、乳及乳制品

5.3.2.1 称取试样后，加入 1.00 mL 乙酸镁溶液（3.3）或 3.00 mL 乙酸镁溶液（3.2），使试样完全润湿。放置 10 min 后，在水浴上将水分蒸干，以下步骤按 5.3.1 自“先在电热板上以小火加热……”起操作。按式（2）计算。

5.3.2.2 吸取 3 份与 5.3.2.1 相同浓度和体积的乙酸镁溶液，做 3 次试剂空白试验。当 3 次试验结果的标准偏差小于 0.003 g 时，取算术平均值作为空白值。若标准偏差超过 0.003 g 时，应重新做空白值试验。

6 分析结果的表述

试样中灰分按式(1)、(2)计算

$$X_1=\frac{m_1-m_2}{m_3-m_2}\times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

$$X_2=\frac{m_1-m_2-m_0}{m_3-m_2}\times 100 \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X_1（测定时未加乙酸镁溶液）——试样中灰分的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

X_2（测定时加入乙酸镁溶液）——试样中灰分的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

m_0——氧化镁(乙酸镁灼烧后生成物)的质量，单位为克（g）；

m_1——坩埚和灰分的质量，单位为克（g）；

m_2——坩埚的质量，单位为克（g）；

m_3——坩埚和试样的质量，单位为克（g）。

试样中灰分含量≥10 g/100 g 时，保留三位有效数字；试样中灰分含量＜10 g/100 g 时，保留二位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.5—2010

食品安全国家标准
食品中蛋白质的测定

National food safety standard

Determination of protein in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5009.5-2003《食品中蛋白质的测定》、GB/T 14771-1993《食品中蛋白质的测定方法》和GB/T 5413.1-1997《婴幼儿配方食品和乳粉蛋白质的测定》。

本标准与GB/T 5009.5-2003相比主要修改如下：

——在第一法中增加了自动蛋白质测定仪的方法；

——增加了燃烧法，作为第三法；

——修改了换算系数；

——对计算结果的有效数字规定进行了修改；

——增加pH计对滴定终点的判定。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5009.5-1985、GB/T 5009.5-2003；

——GB 5413.1-1985、GB/T 5413.1-1997 ；

——GB/T 14771-1993。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中蛋白质的测定

1 范围

本标准规定了食品中蛋白质的测定方法。

本标准第一法和第二法适用于各种食品中蛋白质的测定，第三法适用于蛋白质含量在 10 g/100 g 以上的粮食、豆类、奶粉、米粉、蛋白质粉等固体试样的筛选测定。

本标准不适用于添加无机含氮物质、有机非蛋白质含氮物质的食品测定。

第一法 凯氏定氮法

2 规范性引用性文件

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

3 原理

食品中的蛋白质在催化加热条件下被分解，产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵。碱化蒸馏使氨游离，用硼酸吸收后以硫酸或盐酸标准滴定溶液滴定，根据酸的消耗量乘以换算系数，即为蛋白质的含量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法中所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$）。

4.2 硫酸钾（K_2SO_4）。

4.3 硫酸（H_2SO_4 密度为 1.84g/L）。

4.4 硼酸（H_3BO_3）。

4.5 甲基红指示剂（$C_{15}H_{15}N_3O_2$）。

4.6 溴甲酚绿指示剂（$C_{21}H_{14}Br_4O_5S$）。

4.7 亚甲基蓝指示剂（$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$）。

4.8 氢氧化钠（NaOH）。

4.9 95%乙醇（C_2H_5OH）。

4.10 硼酸溶液（20 g/L）：称取 20 g 硼酸，加水溶解后并稀释至 1000 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.11 氢氧化钠溶液（400 g/L）：称取 40 g 氢氧化钠加水溶解后，放冷，并稀释至 100 mL。

4.12 硫酸标准滴定溶液（0.0500 mol/L）或盐酸标准滴定溶液（0.0500 mol/L）。

4.13 甲基红乙醇溶液（1 g/L）：称取 0.1g 甲基红，溶于 95%乙醇，用 95%乙醇稀释至 100 mL。

4.14 亚甲基蓝乙醇溶液（1 g/L）：称取 0.1g 亚甲基蓝，溶于 95%乙醇，用 95%乙醇稀释至 100 mL。

4.15 溴甲酚绿乙醇溶液（1 g/L）：称取 0.1g 溴甲酚绿，溶于 95%乙醇，用 95%乙醇稀释至 100 mL。

4.16 混合指示液：2 份甲基红乙醇溶液（4.13）与 1 份亚甲基蓝乙醇溶液（4.14）临用时混合。也可用 1 份甲基红乙醇溶液（4.13）与 5 份溴甲酚绿乙醇溶液（4.15）临用时混合。

5 仪器和设备

5.1 天平：感量为 1mg。

5.2 定氮蒸馏装置：如图 1 所示。

5.3 自动凯氏定氮仪。

6 分析步骤

6.1 凯氏定氮法

6.1.1 试样处理：称取充分混匀的固体试样 0.2 g～2 g、半固体试样 2 g～5 g 或液体试样 10 g～25 g（约相当于 30 mg～40 mg 氮），精确至 0.001 g，移入干燥的 100 mL、250 mL 或 500 mL 定氮瓶中，加入 0.2 g 硫酸铜（4.1）、6 g 硫酸钾（4.2）及 20 mL 硫酸（4.3），轻摇后于瓶口放一小漏斗，将瓶以 45°角斜支于有小孔的石棉网上。小心加热，待内容物全部炭化，泡沫完全停止后，加强火力，并保持瓶内液体微沸，至液体呈蓝绿色并澄清透明后，再继续加热 0.5 h～1 h。取下放冷，小心加入 20 mL 水。放冷后，移入 100 mL 容量瓶中，并用少量水洗定氮瓶，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀备用。同时做试剂空白试验。

6.1.2 测定：按图 1 装好定氮蒸馏装置，向水蒸气发生器内装水至 2/3 处，加入数粒玻璃珠，加甲基红乙醇溶液（4.13）数滴及数毫升硫酸（4.3），以保持水呈酸性，加热煮沸水蒸气发生器内的水并保持沸腾。

6.1.3 向接收瓶内加入 10.0 mL 硼酸溶液(4.10)及 1 滴～2 滴混合指示液（4.16），并使冷凝管的下端插入液面下，根据试样中氮含量，准确吸取 2.0 mL～10.0 mL 试样处理液由小玻杯注入反应室，以 10 mL 水洗涤小玻杯并使之流入反应室内，随后塞紧棒状玻塞。将 10.0 mL 氢氧化钠溶液(4.11)倒入小玻杯，提起玻塞使其缓缓流入反应室，立即将玻塞盖紧，并加水于小玻杯以防漏气。夹紧螺旋夹，开始蒸馏。蒸馏 10 min 后移动蒸馏液接收瓶，液面离开冷凝管下端，再蒸馏 1 min。然后用少量水冲洗冷凝管下端外部，取下蒸馏液接收瓶。以硫酸或盐酸标准滴定溶液(4.12)滴定至终点，其中 2 份甲基红乙醇溶液(4.13)与 1 份亚甲基蓝乙醇溶液(4.14)指示剂，颜色由紫红色变成灰色，pH 5.4；1 份甲基红乙醇溶液(4.13)与 5 份溴甲酚绿乙醇溶液(4.15)指示剂，颜色由酒红色变成绿色，pH 5.1。同时作试剂空白。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

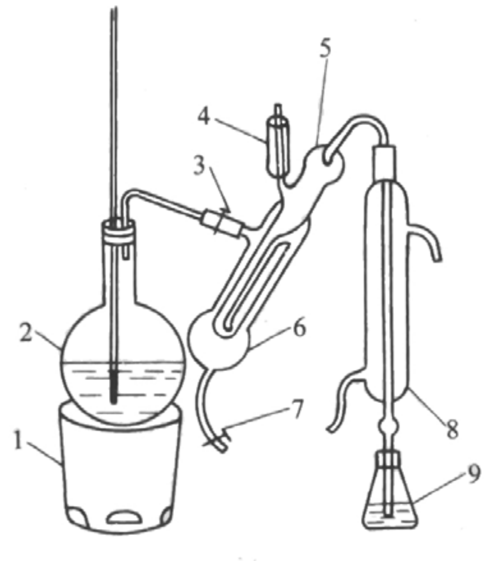


图 1　定氮蒸馏装置图

1－电炉；2－水蒸气发生器（2 L 烧瓶）；3－螺旋夹；4－小玻杯及棒状玻塞；5－反应室；6－反应室外层；7－橡皮管及螺旋夹；8－冷凝管；9－蒸馏液接收瓶。

6.2 自动凯氏定氮仪法

称取固体试样 0.2 g～2 g、半固体试样 2 g～5 g 或液体试样 10 g～25 g（约相当于 30 mg～40 mg 氮），精确至 0.001 g。按照仪器说明书的要求进行检测。

7　分析结果的表述

试样中蛋白质的含量按式（1）进行计算。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.0140}{m \times V_3 / 100} \times F \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中蛋白质的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

V_1——试液消耗硫酸或盐酸标准滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2——试剂空白消耗硫酸或盐酸标准滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

V_3——吸取消化液的体积，单位为毫升（mL）；

c——硫酸或盐酸标准滴定溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

0.0140——1.0 mL 硫酸[$c\ (1/2H_2SO_4)$＝1.000 mol/L]或盐酸[c (HCl) ＝1.000 mol/L]标准滴定溶液相当的氮的质量，单位为克（g）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

F——氮换算为蛋白质的系数。一般食物为 6.25；纯乳与纯乳制品为 6.38；面粉为 5.70；玉米、高粱为 6.24；花生为 5.46；大米为 5.95；大豆及其粗加工制品为 5.71；大豆蛋白制品为 6.25；肉与肉制品为 6.25；大麦、小米、燕麦、裸麦为 5.83；芝麻、向日葵为 5.30；复合配方食品为 6.25。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，蛋白质含量≥1 g/100 g 时，结果保留三位有效数字；蛋白质含量＜1 g/100 g 时，结果保留两位有效数字。

8　精密度

食品伙伴网http://www.foodmate.net

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第二法 分光光度法

9 原理

食品中的蛋白质在催化加热条件下被分解，分解产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵，在 pH 4.8 的乙酸钠-乙酸缓冲溶液中与乙酰丙酮和甲醛反应生成黄色的 3,5-二乙酰-2,6-二甲基-1,4-二氢化吡啶化合物。在波长 400 nm 下测定吸光度值，与标准系列比较定量，结果乘以换算系数，即为蛋白质含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法中所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

10.1 硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$）。

10.2 硫酸钾（K_2SO_4）。

10.3 硫酸（H_2SO_4 密度为 1.84 g/L）：优级纯。

10.4 氢氧化钠（NaOH）。

10.5 对硝基苯酚（$C_6H_5NO_3$）。

10.6 乙酸钠（$CH_3COONa \cdot 3H_2O$）。

10.7 无水乙酸钠（CH_3COONa）。

10.8 乙酸（CH_3COOH）：优级纯。

10.9 37%甲醛（HCHO）。

10.10 乙酰丙酮（$C_5H_8O_2$）。

10.11 氢氧化钠溶液（300 g/L）：称取 30 g 氢氧化钠加水溶解后，放冷，并稀释至 100 mL。

10.12 对硝基苯酚指示剂溶液（1 g/L）：称取 0.1 g 对硝基苯酚指示剂溶于 20 mL 95%乙醇中，加水稀释至 100 mL。

10.13 乙酸溶液（1 mol/L）：量取 5.8 mL 乙酸（10.8），加水稀释至 100 mL。

10.14 乙酸钠溶液（1 mol/L）：称取 41 g 无水乙酸钠（10.7）或 68 g 乙酸钠（10.6），加水溶解后并稀释至 500 mL。

10.15 乙酸钠-乙酸缓冲溶液：量取 60 mL 乙酸钠溶液（10.14）与 40 mL 乙酸溶液（10.13）混合，该溶液 pH 4.8。

10.16 显色剂：15 mL 甲醛（10.9）与 7.8 mL 乙酰丙酮（10.10）混合，加水稀释至 100 mL，剧烈振摇混匀（室温下放置稳定 3d）。

10.17 氨氮标准储备溶液（以氮计）（1.0 g/L）：称取 105 ℃干燥 2 h 的硫酸铵 0.4720 g 加水溶解后移于 100 mL 容量瓶中，并稀释至刻度，混匀，此溶液每毫升相当于 1.0 mg 氮。

10.18 氨氮标准使用溶液（0.1 g/L）：用移液管吸取 10.00 mL 氨氮标准储备液（10.17）于 100ml 容

食品伙伴网http://www.foodmate.net

量瓶内，加水定容至刻度，混匀，此溶液每毫升相当于0.1mg氮。

11 仪器和设备

11.1 分光光度计。

11.2 电热恒温水浴锅：100 ℃ ± 0.5 ℃。

11.3 10 mL具塞玻璃比色管。

11.4 天平：感量为1mg。

12 分析步骤

12.1 试样消解

称取经粉碎混匀过40目筛的固体试样0.1 g～0.5 g（精确至0.001 g）、半固体试样0.2 g～1 g（精确至0.001 g）或液体试样1 g～5 g（精确至0.001 g），移入干燥的100 mL或250 mL定氮瓶中，加入0.1 g硫酸铜、1 g硫酸钾及5 mL硫酸（10.3），摇匀后于瓶口放一小漏斗，将定氮瓶以45°角斜支于有小孔的石棉网上。缓慢加热，待内容物全部炭化，泡沫完全停止后，加强火力，并保持瓶内液体微沸，至液体呈蓝绿色澄清透明后，再继续加热半小时。取下放冷，慢慢加入20 mL水，放冷后移入50 mL或100 mL容量瓶中，并用少量水洗定氮瓶，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀备用。按同一方法做试剂空白试验。

12.2 试样溶液的制备

吸取2.00 mL～5.00 mL试样或试剂空白消化液于50 mL或100 mL容量瓶内，加1滴～2滴对硝基苯酚指示剂溶液（10.12），摇匀后滴加氢氧化钠溶液（10.11）中和至黄色，再滴加乙酸溶液（10.13）至溶液无色，用水稀释至刻度，混匀。

12.3 标准曲线的绘制

吸取0.00 mL、0.05 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL和1.00 mL氨氮标准使用溶液（相当于0.00 μg、5.00 μg、10.0 μg 、20.0 μg、40.0 μg、60.0 μg、80.0 μg和100.0 μg氮），分别置于10 mL比色管中。加4.0 mL乙酸钠-乙酸缓冲溶液（10.15）及4.0 mL显色剂（10.16），加水稀释至刻度，混匀。置于100 ℃水浴中加热15 min。取出用水冷却至室温后，移入1 cm比色杯内，以零管为参比，于波长400 nm处测量吸光度值，根据标准各点吸光度值绘制标准曲线或计算线性回归方程。

12.4 试样测定

吸取0.50 mL～2.00 mL（约相当于氮＜100 μg）试样溶液和同量的试剂空白溶液，分别于10 mL比色管中。以下按12.3自“加4 mL乙酸钠-乙酸缓酸溶液（pH 4.8）及4 mL显色剂……”起操作。试样吸光度值与标准曲线比较定量或代入线性回归方程求出含量。

13 分析结果的表述

试样中蛋白质的含量按式（2）进行计算。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

$$X=\frac{(c-c_0)}{m\times\frac{V_2}{V_1}\times\frac{V_4}{V_3}\times1000\times1000}\times100\times F \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X ——试样中蛋白质的含量，单位为克每百克（g/100g）；

c ——试样测定液中氮的含量，单位为微克（μg）；

c_0——试剂空白测定液中氮的含量，单位为微克（μg）；

V_1 ——试样消化液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——制备试样溶液的消化液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样溶液总体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——测定用试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

F ——氮换算为蛋白质的系数。一般食物为 6.25；纯乳与纯乳制品为 6.38；面粉为 5.70；玉米、高粱为 6.24；花生为 5.46；大米为 5.95；大豆及其粗加工制品为 5.71；大豆蛋白制品为 6.25；肉与肉制品为 6.25；大麦、小米、燕麦、裸麦为 5.83；芝麻、向日葵为 5.30；复合配方食品为 6.25。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，蛋白质含量≥1 g/100 g 时，结果保留三位有效数字；蛋白质含量＜1 g/100 g 时，结果保留两位有效数字。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第三法 燃烧法

15 原理

试样在 900 ℃～1200 ℃高温下燃烧，燃烧过程中产生混合气体，其中的碳、硫等干扰气体和盐类被吸收管吸收，氮氧化物被全部还原成氮气，形成的氮气气流通过热导检测仪（TCD）进行检测。

16 仪器和设备

16.1 氮/蛋白质分析仪。

16.2 天平：感量为 0.1mg。

17 分析步骤

按照仪器说明书要求称取 0.1 g～1.0 g 充分混匀的试样（精确至 0.0001 g），用锡箔包裹后置于样品盘上。试样进入燃烧反应炉（900 ℃～1200 ℃）后，在高纯氧（≥99.99%）中充分燃烧。燃烧炉中的产物（NOx）被载气 CO_2 运送至还原炉（800 ℃）中，经还原生成氮气后检测其含量。

18 分析结果的表述

试样中蛋白质的含量按式（3）进行计算。

$$X=C\times F \quad \cdots\cdots (3)$$

食品伙伴网http://www.foodmate.net

式中：

X——试样中蛋白质的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

C——试样中氮的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

F——氮换算为蛋白质的系数。一般食物为 6.25；纯乳与纯乳制品为 6.38；面粉为 5.70；玉米、高粱为 6.24；花生为 5.46；大米为 5.95；大豆及其粗加工制品为 5.71；大豆蛋白制品为 6.25；肉与肉制品为 6.25；大麦、小米、燕麦、裸麦为 5.83；芝麻、向日葵为 5.30；复合配方食品为 6.25。

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

19 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

20 其他

本方法第一法当称样量为 5.0 g 时，定量检出限为 8 mg/ 100 g。

本方法第二法当称样量为 5.0 g 时，定量检出限为 0.1 mg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.3—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中脂肪的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5009.46-2003《乳与乳制品卫生标准的分析方法》中脂肪的测定、GB/T 5409-85《牛乳检验方法》中脂肪的测定、GB/T 5416-85《奶油检验方法》中脂肪的测定、GB/T 5413.3-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 脂肪的测定》。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5409-85；

——GB/T 5413.3-1997；

——GB/T 5416-85；

——GB 5009.46-1985、GB/T 5009.46-1996、GB/T 5009.46-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中脂肪的测定

1 范围

本标准规定了巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳、调制乳、乳粉、炼乳、奶油、稀奶油、干酪和婴幼儿配方食品中脂肪的测定方法。

本标准第一法适用于巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳、调制乳、乳粉、炼乳、奶油、稀奶油、干酪和婴幼儿配方食品中脂肪的测定；第二法适用于巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳中脂肪的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法

3 原理

用乙醚和石油醚抽提样品的碱水解液，通过蒸馏或蒸发去除溶剂，测定溶于溶剂中的抽提物的质量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 氨水（NH_4OH）：质量分数约 25%。

注：可使用比此浓度更高的氨水。

4.3 乙醇（C_2H_5OH）：体积分数至少为 95%。

4.4 乙醚（$C_4H_{10}O$）：不含过氧化物，不含抗氧化剂，并满足试验的要求。

4.5 石油醚（C_nH_{2n+2}）：沸程 30 ℃～60 ℃。

4.6 混合溶剂：等体积混合乙醚（4.4）和石油醚（4.5），使用前制备。

4.7 碘溶液（I_2）：约 0.1 mol/L。

4.8 刚果红溶液（$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$）：将 1 g 刚果红溶于水中，稀释至 100 mL。

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

4.9 盐酸（6 mol/L）：量取 50 mL 盐酸（12 mol/L）缓慢倒入 40 mL 水中，定容至 100 mL，混匀。

5 仪器和设备

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1 分析天平：感量为 0.1 mg。

5.2 离心机：可用于放置抽脂瓶或管，转速为 500 转/分钟～600 转/分钟，可在抽脂瓶外端产生 80 g～90 g 的重力场。

5.3 烘箱。

5.4 水浴。

5.5 抽脂瓶：抽脂瓶应带有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，后放入 60 ℃或 60 ℃以上的水中保持至少 15 min，冷却后使用。不用时需浸泡在水中，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。

6 分析步骤

6.1 用于脂肪收集的容器（脂肪收集瓶）的准备

于干燥的脂肪收集瓶中加入几粒沸石，放入烘箱中干燥1 h。使脂肪收集瓶冷却至室温，称量，精确至0.1 mg。

注：脂肪收集瓶可根据实际需要自行选择。

6.2 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10 mL水代替试样。

6.3 测定

6.3.1 巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳、调制乳

称取充分混匀试样10 g（精确至0.0001 g）于抽脂瓶中。

6.3.1.1 加入 2.0 mL 氨水（4.2），充分混合后立即将抽脂瓶放入 65 ℃±5 ℃的水浴中，加热 15 min～20min，不时取出振荡。取出后，冷却至室温。静止 30 s 后可进行下一步骤。

6.3.1.2 加入 10 mL 乙醇（4.3），缓和但彻底地进行混合，避免液体太接近瓶颈。如果需要，可加入两滴刚果红溶液（4.8）。

6.3.1.3 加入 25 mL 乙醚（4.4），塞上瓶塞，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 1 min，也可采用手动振摇方式。但均应注意避免形成持久乳化液。

抽脂瓶冷却后小心地打开塞子，用少量的混合溶剂冲洗塞子和瓶颈，使冲洗液流入抽脂瓶。

6.3.1.4 加入 25 mL 石油醚（4.5），塞上重新润湿的塞子，按 6.3.1.3 所述，轻轻振荡 30 s。

6.3.1.5 将加塞的抽脂瓶放入离心机中，在 500 转/分钟～600 转/分钟下离心 5 min。否则将抽脂瓶静止至少 30 min，直到上层液澄清，并明显与水相分离。

6.3.1.6 小心地打开瓶塞，用少量的混合溶剂（4.6）冲洗塞子和瓶颈内壁，使冲洗液流入抽脂瓶。

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。

6.3.1.7 将上层液尽可能地倒入已准备好的加入沸石的脂肪收集瓶中，避免倒出水层（见图 2）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

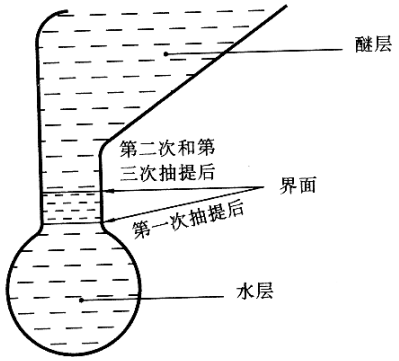


图1 倾倒醚层前

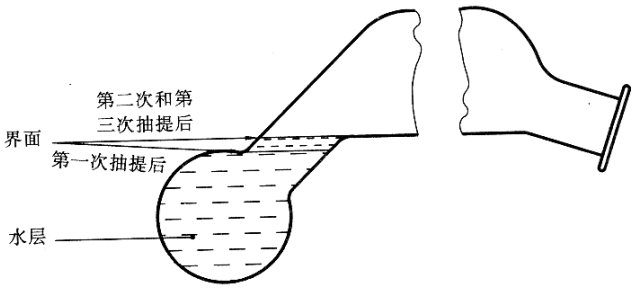


图2 倾倒醚层后

6.3.1.8 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。要防止溶剂溅到抽脂瓶的外面。

6.3.1.9 向抽脂瓶中加入 5 mL 乙醇，用乙醇冲洗瓶颈内壁，按 6.3.1.2 所述进行混合。重复 6.3.1.3～6.3.1.8 操作，再进行第二次抽提，但只用 15 mL 乙醚和 15 mL 石油醚。

6.3.1.10 重复 6.3.1.2～6.3.1.8 操作，再进行第三次抽提，但只用 15 mL 乙醚和 15 mL 石油醚。

注：如果产品中脂肪的质量分数低于5 %，可只进行两次抽提。

6.3.1.11 合并所有提取液，既可采用蒸馏的方法除去脂肪收集瓶中的溶剂，也可于沸水浴上蒸发至干来除掉溶剂。蒸馏前用少量混合溶剂冲洗瓶颈内部。

6.3.1.12 将脂肪收集瓶放入 102 ℃±2 ℃的烘箱中加热 1 h，取出脂肪收集瓶，冷却至室温，称量，精确至 0.1 mg。

6.3.1.13 重复 6.3.1.12 操作，直到脂肪收集瓶两次连续称量差值不超过 0.5 mg，记录脂肪收集瓶和抽提物的最低质量。

6.3.1.14 为验证抽提物是否全部溶解，向脂肪收集瓶中加入 25 mL 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，则含抽提物的脂肪收集瓶的最终质量和最初质量之差，即为脂肪含量。

6.3.1.15 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。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，再用石油醚冲洗脂肪收集瓶口的内部。

最后，用混合溶剂冲洗脂肪收集瓶口的外部，避免溶液溅到瓶的外壁。将脂肪收集瓶放入102 ℃±2 ℃的烘箱中，加热1 h，按6.3.1.12和6.3.1.13所述操作。

6.3.1.16 取 6.3.1.13 中测得的质量和 6.3.1.15 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，步骤如附录A（标准的附录）所述。

6.3.2 乳粉和乳基婴幼儿食品

称取混匀后的试样，高脂乳粉、全脂乳粉、全脂加糖乳粉和乳基婴幼儿食品：约1 g（精确至0.0001 g），脱脂乳粉、 乳清粉、酪乳粉：约1.5 g（精确至0.0001 g）。

6.3.2.1 不含淀粉样品

加入 10 mL 65 ℃±5 ℃的水，将试样洗入抽脂瓶的小球中，充分混合，直到试样完全分散，放入流动水中冷却。

6.3.2.2 含淀粉样品

将试样放入抽脂瓶中，加入约0.1 g的淀粉酶（4.1）和一小磁性搅拌棒，混合均匀后，加入8 mL～10 mL 45 ℃的蒸馏水，注意液面不要太高。盖上瓶塞于搅拌状态下，置65 ℃水浴中2 h，每隔10 min摇混一次。为检验淀粉是否水解完全可加入两滴约0.1 mol/L的碘溶液（4.7），如无蓝色出现说明水解完全，否则将抽脂瓶重新置于水浴中，直至无蓝色产生。冷却抽脂瓶。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

以下操作同6.3.1.1～6.3.1.16。

6.3.3 炼乳

脱脂炼乳、全脂炼乳和部分脱脂炼乳称取约3 g～5 g、高脂炼乳称取约1.5 g（精确至0.0001 g），用10 mL蒸馏水，分次洗入抽脂瓶小球中，充分混合均匀。

以下操作同6.3.1.1～6.3.1.16。

6.3.4 奶油、稀奶油

先将奶油试样放入温水浴中溶解并混合均匀后，称取试样约0.5 g样品（精确至0.0001 g），稀奶油称取1g于抽脂瓶中，加入8 mL～10 mL 45℃的蒸馏水。加 2 mL氨水充分混匀。

以下操作同6.3.1.1～6.3.1.14。

6.3.5 干酪

称取约2 g研碎的试样（精确至0.0001 g）于抽脂瓶中，加10 mL盐酸（4.9），混匀，加塞，于沸水中加热20 min～30 min。以下操作按6.3.1.2～6.3.1.16操作。

7 分析结果表述

样品中脂肪含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m} \times 100 \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X——样品中脂肪含量，单位为克每百克（g/100g）；

m——样品的质量，单位为克（g）；

m_1——6.3.1.13 中测得的脂肪收集瓶和抽提物的质量，单位为克（g）；

m_2——脂肪收集瓶的质量，或在有不溶物存在下，6.3.1.15 中测得的脂肪收集瓶和不溶物的质量，单位为克（g）；

m_3——空白试验中，脂肪收集瓶和 6.3.1.13 中测得的抽提物的质量，单位为克（g）；

m_4——空白试验中脂肪收集瓶的质量，或在有不溶物存在时，6.3.1.15 中测得的脂肪收集瓶和不溶物的质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果之差应符合：

脂肪含量≥15%，≤0.3g/100g；

脂肪含量 5～15%，≤0.2g/100g；

脂肪含量≤5%，≤0.1g/100g。

9 其他

实验过程注意事项：

9.1 空白试验检验试剂

要进行空白试验，以消除环境及温度对检验结果的影响。

进行空白试验时在脂肪收集瓶中放入 1 g 新鲜的无水奶油。必要时，于每 100 mL 溶剂中加入 1 g 无水奶油后重新蒸馏，重新蒸馏后必须尽快使用。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

9.2 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。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 0.5 mg。在常规测定中，可忽略不计。

如果全部试剂空白残余物大于 0.5 mg，则分别蒸馏 100 mL 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 0.5 mg。 否则应更换不合格的试剂或对试剂进行提纯。

9.3 乙醚中过氧化物的检验

取一只玻璃小量筒，用乙醚冲洗，然后加入 10 mL 乙醚，再加入 1 mL 新制备的 100 g/L 的碘化钾溶剂，振荡，静置 1 min，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 80 cm^2 锌箔。

使用前，将锌片完全浸入每升中含有 10 g 五水硫酸铜和 2 mL 质量分数为 98 %的硫酸中 1 min，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。

第二法

10 原理

在乳中加入硫酸破坏乳胶质性和覆盖在脂肪球上的蛋白质外膜，离心分离脂肪后测量其体积。

11 试剂和材料

11.1 硫酸（H_2SO_4）：分析纯，ρ_{20} 约 1.84 g/L。

11.2 异戊醇（$C_5H_{12}O$）：分析纯。

12 仪器和设备

12.1 乳脂离心机。

12.2 盖勃氏乳脂计：最小刻度值为 0.1 %，见图 3。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

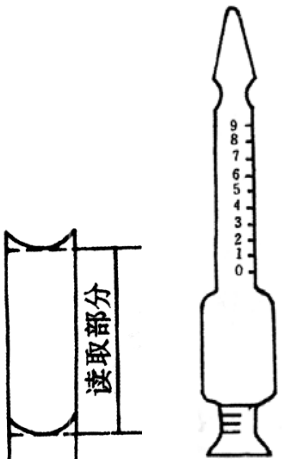


图 3 盖勃氏乳脂计

12.3 10.75 mL 单标乳吸管。

13 分析步骤

于盖勃氏乳脂计中先加入 10 mL 硫酸（11.1），再沿着管壁小心准确加入 10.75 mL 样品，使样品与硫酸不要混合，然后加 1 mL 异戊醇（11.2），塞上橡皮塞，使瓶口向下，同时用布包裹以防冲出，用力振摇使呈均匀棕色液体，静置数分钟（瓶口向下），置 65 ℃～70 ℃水浴中 5 min，取出后置于乳脂离心机中以 1100 转/分钟的转速离心 5 min，再置于 65 ℃～70 ℃水浴水中保温 5 min（注意水浴水面应高于乳脂计脂肪层）。取出，立即读数，即为脂肪的百分数。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（资料性附录）
使用带虹吸管或洗瓶的抽脂管的操作步骤

A.1 步骤

A.1.1 脂肪收集瓶的准备：见6.1。

A.1.2 空白试验：见6.2和9.2。

A.1.3 测定

A.1.3.1 巴氏杀菌、灭菌乳、生乳、发酵乳、调制乳：称取充分混匀样品 10 g（精确至 0.001 g）于抽脂管底部。

乳粉及乳基婴幼儿食品：称取混匀后的样品高脂乳粉、全脂乳粉、全脂加糖乳粉和乳基婴幼儿配方食品：约1g，脱脂乳粉、 乳清粉、酪乳粉：约1.5 g（精确至0.001 g），于抽脂管底部，加入10 mL 65 ℃±5 ℃的水，充分混合，直到样品完全分散，放入流动水中冷却。

炼乳：脱脂炼乳称取约 10 g、全脂炼乳和部分脱脂炼乳称取约 3 g～5 g；高脂炼乳称取约 1.5g（精确至 0.001g），于抽脂管底部。加入 10 mL 水，充分混合均匀。

奶油、稀奶油：先将奶油样品放入温水浴中溶解并混合均匀后，奶油称取约 0.5 g 样品，稀奶油称取 1g 于抽脂管底部（精确至 0.001 g）。

上述样品接以下 A.1.3.1.1 操作。

干酪：称取约 2 g 研碎的样品（精确至 0.001 g）。加水 9 mL、氨水 2 mL，用玻璃棒搅拌均匀后微微加热使酪蛋白溶解，用盐酸（4.9）中和后再加盐酸（4.9）10 mL，加海砂 0.5 g，盖好玻璃盖，以文火煮沸 5 min，冷却后将烧杯内容物移入抽脂管底部，用 25 mL 乙醚冲洗烧杯，洗液并入抽脂管中，以下操作按 A.1.3.1.4“加软木塞”以后操作。

A.1.3.1.1 加入2 mL氨水，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。

A.1.3.1.2 将抽脂管放入65 ℃±5 ℃的水浴中，加热15 min～20 min，偶尔振荡样品管，然后冷却至室温。

A.1.3.1.3 加入10 mL乙醇，在管底部轻轻彻底地混合，必要时加入两滴刚果红溶液。

A.1.3.1.4 加入25 mL乙醚，加软木塞（已被水饱和），或用水浸湿的其他瓶塞，上下反转1 min，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（使用洗瓶）冲洗塞子和管颈，使冲洗液流入管中。

A.1.3.1.5 加入25 mL石油醚，加塞（塞子重新用水润湿），按A.1.3.1.3所述轻轻振荡30 s。

A.1.3.1.6 将加塞的管子放入离心机中，在500 转/分钟～600 转/分钟下离心1 min～5 min。或静止至少30 min，直到上层液澄清，并明显地与水相分离，冷却。

A.1.3.1.7 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。

A.1.3.1.8 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4 mm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的脂肪收集瓶中，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，收集冲洗液于脂肪收集瓶中。

A.1.3.1.9 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，将冲洗液移入脂肪收集瓶中。

用少量的混合溶剂冲洗出口，冲洗液收集于瓶中，必要时，按6.3.1.11所述，通过蒸馏或蒸发去除部分溶剂。

A.1.3.1.10 再松开管颈处的接头，微微抬高接头，加入5 mL乙醇，用乙醇冲洗长支管，如A.1.3.1.3

食品伙伴网http://www.foodmate.net

所述混合。

A.1.3.1.11　重复A.1.3.1.4～A.1.3.1.9步骤进行第二次抽提，但仅用15 mL乙醇和15 mL石油醚，抽提之后，在移开管接头时，用乙醚冲洗内部长支管。

A.1.3.1.12　重复A.1.3.1.4～A.1.3.1.9步骤，不加乙醇，进行第三次抽提，仅用15 mL乙醇和15 mL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。

A.1.3.1.13　以下按6.3.1.11～6.3.1.15所述进行。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.5—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定

National food safety standard

Determination of lactose and sucrose in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.5-1997《婴幼儿配方食品和乳粉　乳糖、蔗糖和总糖的测定》。

本标准与GB/T 5413.5-1997相比，主要变化如下：

——增加了蒸发光散射检测器。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.5-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 高效液相色谱法

3 原理

试样中的乳糖、蔗糖经提取后，利用高效液相色谱柱分离，用示差折光检测器或蒸发光散射检测器检测，外标法进行定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 标准溶液

4.3.1 乳糖标准贮备液(20 mg/mL)：称取在 94 ℃ ±2 ℃烘箱中干燥 2 h 的乳糖标样 2 g(精确至 0.1 mg)，溶于水中，用水稀释至 100 mL 容量瓶中。放置 4 ℃冰箱中。

4.3.2 乳糖标准工作液：分别吸取乳糖标准贮备液（4.3.1）0 mL，1 mL，2 mL，3 mL，4 mL，5 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈(4.1)定容至刻度。配成乳糖标准系列工作液，浓度分别为 0 mg/mL，2 mg/mL，4 mg/mL，6 mg/mL，8 mg/mL，10 mg/mL。

4.3.3 蔗糖标准溶液(10 mg/mL)：称取在 105 ℃ ±2 ℃烘箱中干燥 2 h 的蔗糖标样 1 g(精确到 0.1 mg)，溶于水中，用水稀释至 100mL 容量瓶中。放置 4 ℃冰箱中。

4.3.4 蔗糖标准工作液：分别吸取蔗糖标准溶液（4.3.3）0 mL，1 mL，2 mL，3 mL，4 mL，5 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈(4.1)定容至刻度。配成蔗糖标准系列工作液，浓度分别为 0 mg/mL，1 mg/mL，2 mg/mL，3 mg/mL，4 mg/mL，5 mg/mL。

5 仪器和设备

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1 天平：感量为 0.1 mg。

5.2 高效液相色谱仪，带示差折光检测器或蒸发光散射检测器。

5.3 超声波振荡器。

6 分析步骤

6.1 试样处理

称取固态试样 1 g 或液态试样称取 2.5 g（精确到 0.1 mg）于 50 mL 容量瓶中，加 15 mL 50 ℃～60 ℃水溶解，于超声波振荡器中振荡 10 min，用乙腈（4.1）定容至刻度，静置数分钟，过滤。取 5.0 mL 过滤液于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（4.1）定容，通过 0.45 μm 滤膜过滤，滤液供色谱分析。可根据具体试样进行稀释。

6.2 测定

6.2.1 参考色谱条件

色谱柱：氨基柱 4.6 mm ×250 mm，5 μm，或具有同等性能的色谱柱；

流动相：乙腈(4.2)—水=70+30；

流速：1 mL/min；

柱温：35 ℃；

进样量：10 μL；

示差折光检测器条件：温度 33 ℃～37 ℃；

蒸发光散射检测器条件：飘移管温度：85 ℃～90 ℃；

气流量：2.5 L/min；

撞击器：关。

6.2.2 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高，以峰面积或峰高为纵坐标，以标准工作液的浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.2.3 试样溶液的测定

将试样溶液（6.1）注入高效液相色谱仪中，测定峰面积或峰高，从标准曲线中查得试样溶液中糖的浓度。

7 分析结果的表述

试样中糖的含量按式（1）计算：

$$X=\frac{c\times V\times 100\times n}{m\times 1000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中糖的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

c——样液中糖的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

n——样液稀释倍数；

m——试样的质量，单位为克（g）。

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

8 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5 %。

第二法 莱因—埃农氏法

9 原理

乳糖：试样经除去蛋白质后，在加热条件下，以次甲基蓝为指示剂，直接滴定已标定过的费林氏液，根据样液消耗的体积，计算乳糖含量。

蔗糖：试样经除去蛋白质后，其中蔗糖经盐酸水解为还原糖，再按还原糖测定。水解前后的差值乘以相应的系数即为蔗糖含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

10.1 乙酸铅。

10.2 草酸钾。

10.3 磷酸氢二钠。

10.4 盐酸。

10.5 硫酸铜。

10.6 浓硫酸。

10.7 酒石酸钾钠。

10.8 氢氧化钠。

10.9 酚酞。

10.10 乙醇。

10.11 次甲基蓝。

10.12 乙酸铅溶液（200 g/L）：称取 200 g 乙酸铅，溶于水并稀释至 1000 mL。

10.13 草酸钾—磷酸氢二钠溶液：称取草酸钾 30 g，磷酸氢二钠 70 g，溶于水并稀释至 1000 mL。

10.14 盐酸（1+1）：1 体积盐酸与 1 体积的水混合。

10.15 氢氧化钠溶液（300 g/L）：称取 300 g 氢氧化钠，溶于水并稀释至 1000 mL。

10.16 费林氏液（甲液和乙液）

10.16.1 甲液：称取 34.639 g 硫酸铜，溶于水中，加入 0.5 mL 浓硫酸，加水至 500 mL。

10.16.2 乙液：称取 173 g 酒石酸钾钠及 50 g 氢氧化钠溶解于水中，稀释至 500 mL，静置两天后过滤。

10.17 酚酞溶液（5 g/L）：称取 0.5 g 酚酞溶于 100 mL 体积分数为 95 %的乙醇中。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.18　次甲基蓝溶液（10 g/L）：称取 1 g 次甲基蓝于 100 mL 水中。

11　仪器和设备

11.1　天平：感量为 0.1 mg。

11.2　水浴锅：温度可控制在 75 ℃ ±2 ℃。

12　分析步骤

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 94 ℃ ±2 ℃烘箱中干燥 2 h 的乳糖标样约 0.75 g（精确到 0.1 mg），用水溶解并定容至 250 mL。将此乳糖溶液注入一个 50 mL 滴定管中，待滴定。

12.1.1.2　预滴定：吸取 10 mL 费林氏液(甲、乙液各 5 mL)于 250 mL 三角烧瓶中。加入 20 mL 蒸馏水，放入几粒玻璃珠，从滴定管中放出 15 mL 样液于三角瓶中，置于电炉上加热，使其在 2 min 内沸腾，保持沸腾状态 15 s，加入 3 滴次甲基蓝溶液（10.18），继续滴入至溶液蓝色完全褪尽为止，读取所用样液的体积。

12.1.1.3　精确滴定：另取 10 mL 费林氏液（ 甲、乙液各 5 mL）于 250 mL 三角烧瓶中，再加入 20 mL 蒸馏水，放入几粒玻璃珠，加入比预滴定量少 0.5 mL～1.0 mL 的样液，置于电炉上，使其在 2 min 内沸腾，维持沸腾状态 2 min，加入 3 滴次甲基蓝溶液（10.18），以每两秒一滴的速度徐徐滴入，溶液蓝色完全褪尽即为终点，记录消耗的体积。

12.1.1.4　按式（2）、（3）计算费林氏液的乳糖校正值（f_1）：

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

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

式中：

A_1——实测乳糖数，单位为毫克（mg）；

V_1——滴定时消耗乳糖溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m_1——称取乳糖的质量，单位为克（g）；

f_1——费林氏液的乳糖校正值；

AL_1——由乳糖液滴定毫升数查表 1 所得的乳糖数，单位为毫克（mg）。

表 1　乳糖及转化糖因数表（10 mL 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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1（续）

滴定量（mL）	乳糖（mg）	转化糖（mg）	滴定量（mL）	乳糖（mg）	转化糖（mg）
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 1 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 中的校正值后计算。

表 2　乳糖滴定量校正值数

滴定终点时所用的糖液量（mL）	用 10 mL 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

12.1.2　用蔗糖标定

12.1.2.1　称取在 105 ℃±2 ℃烘箱中干燥 2 h 的蔗糖约 0.2 g（精确到 0.1 mg），用 50 mL 水溶解并洗入 100 mL 容量瓶中，加水 10 mL，再加入 10 mL 盐酸（10.14），置于 75 ℃水浴锅中，时时摇动，使溶液温度在 67.0 ℃～69.5 ℃，保温 5 min，冷却后，加 2 滴酚酞溶液（10.17），用氢氧化钠溶液（10.15）调至微粉色，用水定容至刻度。再按 12.1.1.2 和 12.1.1.3 操作。

12.1.2.2　按式（4）、（5）计算费林氏液的蔗糖校正值（f_2）：

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

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

式中：

A_2——实测转化糖数，单位为毫克（mg）；

V_2——滴定时消耗蔗糖溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m_2——称取蔗糖的质量，单位为克（g）；

0.95——果糖分子质量和葡萄糖分子质量之和与蔗糖分子质量的比值；

f_2——费林氏液的蔗糖校正值；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

AL_2——由蔗糖溶液滴定的毫升数查表 1 所得的转化糖数，单位为毫克（mg）。

12.2 乳糖的测定

12.2.1 试样处理

12.2.1.1 称取婴儿食品或脱脂粉 2 g，全脂加糖粉或全脂粉 2.5 g，乳清粉 1 g，精确到 0.1 mg，用 100 mL 水分数次溶解并洗入 250 mL 容量瓶中。

12.2.1.2 徐徐加入 4 mL 乙酸铅溶液（10.12）、4 mL 草酸钾—磷酸氢二钠溶液（10.13），并振荡容量瓶，用水稀释至刻度。静置数分钟，用干燥滤纸过滤，弃去最初 25 mL 滤液后，所得滤液作滴定用。

12.2.2 滴定

12.2.2.1 预滴定：操作同 12.1.1.2。

12.2.2.2 精确滴定：操作同 12.1.1.3。

12.3 蔗糖的测定

12.3.1 样液的转化与滴定

取 50 mL 样液（12.2.1.2）于 100 mL 容量瓶中，以下按 12.1.2.1 自“加 10 mL 水”起依法操作。

13 分析结果的表述

13.1 乳糖

试样中乳糖的含量 X 按式（6）计算

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

式中：

X——试样中乳糖的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）；

F_1——由消耗样液的毫升数查表 1 所得乳糖数，单位为毫克（mg）；

f_1——费林氏液乳糖校正值；

V_1——滴定消耗滤液量，单位为毫升（mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

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

13.2 蔗糖

利用测定乳糖时的滴定量，按式（7）计算出相对应的转化前转化糖数 X_1。

$$X_1=\frac{F_2\times f_2\times 0.25\times 100}{V_1\times m} \quad \cdots\cdots (7)$$

式中：

X_1——转化前转化糖的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）；

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，单位为毫克（mg）；

f_2——费林氏液蔗糖校正值；

V_1——滴定消耗滤液量，单位为毫升（mL）；

m——样品的质量，单位为克（g）。

用测定蔗糖时的滴定量，按式（8）计算出相对应的转化后转化糖 X_2。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

$$X_2 = \frac{F_3 \times f_2 \times 0.50 \times 100}{V_2 \times m} \quad \cdots\cdots (8)$$

式中：

X_2—转化后转化糖的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）；

F_3——由 V_2 查得转化糖数，单位为毫克（mg）；

f_2——费林氏液蔗糖校正值；

m——样品的质量，单位为克（g）；

V_2——滴定消耗的转化液量，单位为毫升（mL）。

试样中蔗糖的含量 X 按式（9）计算

$$X=(X_2—X_1)\times 0.95 \quad \cdots\cdots (9)$$

式中：

X——试样中蔗糖的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）；

X_1——转化前转化糖的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）；

X_2——转化后转化糖的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）。

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

13.3 若试样中蔗糖与乳糖之比超过 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。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 1.5 %。

15 其它

本标准第一法的检出限为 0.3 g/100 g，第二法的检出限为 0.4 g/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.6—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中不溶性膳食纤维的测定

National food safety standard

Determination of insoluble dietary fiber in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.6-1997《婴幼儿配方食品和乳粉　不溶性膳食纤维的测定》。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.6-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中不溶性膳食纤维的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中不溶性膳食纤维的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中不溶性膳食纤维的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

使用中性洗涤剂将试样中的糖、淀粉、蛋白质、果胶等物质溶解除去，不能溶解的残渣为不溶性膳食纤维，主要包括纤维素、半纤维素、木质素、角质和二氧化硅等，并包括不溶性灰分。

4 试剂和材料

4.1 无水亚硫酸钠。

4.2 石油醚：沸程 30 ℃～60 ℃。

4.3 丙酮。

4.4 甲苯。

4.5 EDTA 二钠盐。

4.6 四硼酸钠（含 10 个结晶水）。

4.7 月桂基硫酸钠。

4.8 乙二醇独乙醚。

4.9 无水磷酸氢二钠。

4.10 磷酸。

4.11 磷酸二氢钠。

4.12 α-淀粉酶。

4.13 中性洗涤剂溶液：将 18.61 g EDTA 二钠盐和 6.81 g 四硼酸钠（含 10 个结晶水）置于烧杯中，加水约 100 mL，加热使之溶解，将 30.00 g 月桂基硫酸钠和 10 mL 乙二醇独乙醚溶于约 650 mL 热水中，

食品伙伴网http://www.foodmate.net

合并上述两种溶液，再将 4.56 g 无水磷酸氢二钠溶于 150 mL 热水中，并入上述溶液中，用磷酸调节上述混合液至 pH 6.9～7.1，最后加水至 1000 mL。

4.14 磷酸盐缓冲液：由 38.7 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钠和 61.3 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钠混合而成，pH 为 7.0 ±0.2。

4.15 2.5 % α-淀粉酶溶液：称取 2.5 g α-淀粉酶溶于 100 mL 磷酸盐缓冲溶液中，离心、过滤，滤过的酶液备用。

4.16 耐热玻璃棉（耐热 130 ℃，需耐热并不易折断的玻璃棉）。

5 仪器和设备

5.1 天平：感量为 0.1 mg。

5.2 烘箱：110 ℃～130 ℃。

5.3 恒温箱：37 ℃ ±2 ℃。

5.4 纤维测定仪。

5.5 如没有纤维测定仪，可由下列部件组成：

a) 电热板：带控温装置。

b) 高型无嘴烧杯：600 mL。

c) 坩埚式耐酸玻璃滤器：容量 60 mL，孔径 40 μm～60 μm。

d) 回流冷凝装置。

e) 抽滤装置：由抽滤瓶、抽滤垫及水泵组成。

f) pH 计：精度为 0.01。

6 分析步骤

6.1 称取固体试样 0.5 g～1.0 g 或液体试样 8.0 g（精确到 0.1 mg），置于高型无嘴烧杯中，如试样脂肪含量超过 10 %，需先去除脂肪，例如 1.00 g 试样，用石油醚 30 ℃～60 ℃（4.2）提取 3 次，每次 10 mL。

6.2 加 100 mL 中性洗涤剂溶液（4.13），再加 0.5 g 无水亚硫酸钠（4.1）。

6.3 电炉加热，5 min～10 min 内使其煮沸，移至电热板上，保持微沸 1 h。

6.4 于耐酸玻璃滤器中，铺 1 g～3 g 玻璃棉，移至烘箱内，110 ℃烘 4 h，取出置干燥器中冷至室温，称量，得 m_1（精确到 0.0001 g）。

6.5 将煮沸后试样趁热倒入滤器中，用水泵抽滤。用 500 mL 热水（ 90 ℃～100 ℃），分数次洗烧杯及滤器，抽滤至干。洗净滤器下部的液体和泡沫，塞上橡皮塞。

6.6 于滤器中加酶液（4.15），液面需覆盖纤维，用细针挤压掉其中气泡，加数滴甲苯（4.4），盖上表面皿，37 ℃恒温箱中过夜。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.7 取出滤器，除去底部塞子，抽滤去酶液，并用 300 mL 热水分数次洗去残留酶液，用碘液检查是否有淀粉残留，如有残留，继续加酶水解，如淀粉已除尽，抽干，再以丙酮（4.3）洗 2 次。

6.8 将滤器置烘箱中，110 ℃烘 4 h，取出，置干燥器中，冷至室温，称量，得 m_2（精确到 0.0001 g）。

7 分析结果的表述

试样中不溶性膳食纤维的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X ——试样中不溶性膳食纤维的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

m_1——滤器加玻璃棉的质量，单位为克（g）；

m_2——滤器加玻璃棉及试样中纤维的质量，单位为克（g）；

m——试样质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.9—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定

National food safety standard

Determination of vitamin A, D, E in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.9-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素A、D、E的测定》。

本标准与GB/T 5413.9-1997相比，主要变化如下：

——抗氧化剂由原来的焦性没食子酸改为抗坏血酸；

——将处理方法中的加热回流改为恒温皂化操作；

——增加了标准溶液的校正；

——将原有的单点定量改为标准曲线法；

——增加了维生素D回收率的测定；

——将计算公式进行修改。

本标准附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.9-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样皂化后，经石油醚萃取，维生素A、E用反相色谱法分离，外标法定量；维生素D用正相色谱法净化后，反相色谱法分离，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 α-淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 无水硫酸钠。

4.3 异丙醇：色谱纯。

4.4 乙醇：色谱纯。

4.5 氢氧化钾水溶液：称取固体氢氧化钾 250 g，加入 200 mL 水溶解。

4.6 石油醚：沸程 30 ℃～60 ℃。

4.7 甲醇：色谱纯。

4.8 正己烷：色谱纯。

4.9 环己烷：色谱纯。

4.10 维生素 C 的乙醇溶液（15 g/L）。

4.11 维生素 A、D、E 标准溶液

4.11.1 维生素 A 标准储备液（视黄醇）（100 μg/mL）：精确称取 10 mg 的维生素 A 标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.11.2 维生素E标准储备液（α-生育酚）（500 μg/mL）：精确称取50 mg的维生素E标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中。

4.11.3 维生素D_2标准储备液（100 μg/mL）：精确称取10 mg的维生素D_2标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中。

4.11.4 维生素D_3标准储备液（100 μg/mL）：精确称取10 mg的维生素D_3标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中。

注：维生素A、D、E标准储备液均须-10℃以下避光储存。标准工作液临用前配制。标准储备溶液用前需校正，见附录A。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 恒温磁力搅拌器：20 ℃～80 ℃。

5.4 氮吹仪。

5.5 离心机：转速≥5000转/分钟。

5.6 培养箱：60 ℃±2 ℃。

5.7 天平：感量为0.1 mg。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约5 g或液体试样约50 g（精确到0.1 mg）于250 mL三角瓶中，加入l g α-淀粉酶（4.1），固体试样需用约50 mL 45 ℃～50 ℃的水使其溶解，混合均匀后充氮，盖上瓶塞，置于60 ℃±2 ℃培养箱（5.6）内培养30 min。

6.1.2 不含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约10 g或液体试样约50 g（精确到0.1 mg）于250 mL三角瓶中，固体试样需用约50 mL 45 ℃～50 ℃水使其溶解，混合均匀。

6.2 测定维生素D的试样需要同时做回收率实验。

6.3 待测液的制备

6.3.1 皂化：于上述处理的试样溶液中加入约100 mL维生素C的乙醇溶液（4.10），充分混匀后加25 mL氢氧化钾水溶液（4.5）混匀，放入磁力搅拌棒，充氮排出空气，盖上胶塞。1000 mL的烧杯中加入约300 mL的水，将烧杯放在恒温磁力搅拌器（5.3）上，当水温控制在53 ℃ ±2 ℃时，将三角瓶放入烧杯中，磁力搅拌皂化约45 min后，取出立刻冷却到室温。

6.3.2 提取：用少量的水将皂化液全部转入500 mL分液漏斗中，加入100 mL石油醚（4.6），轻轻摇动，排气后盖好瓶塞，室温下振荡约10 min后静置分层，将水相转入另一500 mL分液漏斗中，按上述方法进行第二次萃取。合并醚液，用水洗至近中性。醚液通过无水硫酸钠过滤脱水，滤液收入500 mL

食品伙伴网http://www.foodmate.net

圆底烧瓶中，于旋转蒸发器上在 40 ℃±2 ℃充氮条件下蒸至近干（绝不允许蒸干）。残渣用石油醚转移至 10 mL 容量瓶中，定容。

6.3.3 从上述容量瓶中准确移取 2.0 mL 石油醚溶液放入试管 A 中，再准确移取 7.0 mL 石油醚溶液放入另一试管 B 中，将试管置于 40 ℃±2 ℃的氮吹仪（5.4）中，将试管 A 和 B 中的石油醚吹干。向试管 A 中加 5.0 mL 甲醇（4.7），振荡溶解残渣。向试管 B 中加 2.0 mL 正己烷（4.8），振荡溶解残渣。再将试管 A 和试管 B 以不低于 5000 转/分钟的速度离心 10 min，取出静置至室温后待测。A 管用来测定维生素 A、E，B 管用来测定维生素 D。

6.4 测定

6.4.1 维生素 A、E 的测定

6.4.1.1 色谱参考条件

色谱柱：C_{18}柱，250 mm ×4.6 mm，5 μm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：维生素A：325 nm；维生素E：294 nm。

柱温：35 ℃±1 ℃。

进样量：20 μL。

6.4.1.2 维生素 A、E 标准曲线的绘制

分别准确吸取维生素 A 标准储备液（4.11.1）0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00 mL、2.50 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 1.00 μg/mL、2.00 μg/mL、3.00 μg/mL、4.00 μg/mL、5.00 μg/mL。

分别准确吸取维生素 E 标准储备液（4.11.2）1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、30.0 μg/mL、40.0 μg/mL、50.0 μg/mL。

分别将维生素 A、E 标准工作液注入液相色谱仪中（色谱图参见附录 B），得到峰高(或峰面积)。以峰高(或峰面积)为纵坐标，以维生素 A、E 标准工作液浓度为横坐标分别绘制维生素 A、E 标准曲线。

6.4.1.3 维生素 A、E 试样的测定

将试液（6.3.3中A管）注入液相色谱仪中，得到峰高(或峰面积)，根据各自标准曲线得到待测溶液中维生素A、E的浓度。

6.4.2 维生素 D 的测定

6.4.2.1 维生素 D 待测液的净化

6.4.2.1.1 色谱参考条件。

色谱柱：硅胶柱，150 mm ×4.6 mm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：环己烷（4.9）与正己烷（4.8）按体积比1：1混合，并按体积分数0.8 %加入异丙醇（4.3）。

流速：1 mL/min。

波长：264 nm。

柱温：35 ℃ ±1 ℃。

进样体积：500 μL。

6.4.2.1.2 取约0.5 mL维生素D标准储备液于10 mL具塞试管中，在40 ℃±2 ℃的氮吹仪（5.4）上吹干。残渣用5 mL正己烷振荡溶解。取该溶液50 μL注入液相色谱仪中测定，确定维生素D保留时间。然后将500 μL待测液（6.3.3中B管）注入液相色谱仪中，根据维生素D标准溶液保留时间收集维生素D馏分于试管C中。将试管C置于40 ℃±2 ℃条件下的氮吹仪中吹干，取出准确加入1.0 mL甲醇（4.7），残渣振荡溶解，即为维生素D测定液。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.4.2.2 维生素 D 测定液的测定

6.4.2.2.1 参考色谱条件

色谱柱：C_{18}柱，250 mm ×4.6 mm，5μm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）。

流速：1 mL/min。

检测波长：264 nm。

柱温：35 ℃ ±1 ℃。

进样量：100 μL。

6.4.2.2.2 标准曲线的绘制

分别准确吸取维生素 D_2（或 D_3）标准储备液（4.11.3、4.11.4）0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL 于 100 棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 0.200 μg/mL、0.400 μg/mL、0.600 μg/mL、0.800 μg/mL、1.000 μg/mL。

分别将维生素 D_2（或 D_3）标准工作液注入液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积)，参见附录 B。以峰高(或峰面积)为纵坐标，以维生素 D_2（或 D_3）标准工作液浓度为横坐标分别绘制标准曲线。

6.4.2.2.3 维生素 D 试样的测定

吸取维生素D测定液（6.4.2.1中C管）100 μL注入液相色谱仪中（色谱图参见附录B），得到峰高（或峰面积），根据标准曲线得到维生素D测定液中维生素D_2（或D_3）的浓度。

维生素 D 回收率测定结果记为回收率校正因子 f，代入测定结果计算公式（2），对维生素 D 含量测定结果进行校正。

7 分析结果的表述

7.1 维生素 A 含量的计算

维生素 A 含量按（1）计算：

$$X = \frac{c_s \times 10/2 \times 5 \times 100}{m} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X——试样中维生素A的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

c_s——从标准曲线得到的维生素 A 待测液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

注：1 μg 视黄醇 =3.33 IU 维生素 A。

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

7.2 维生素 D 含量的计算

维生素 D 含量按（2）计算：

$$X = \frac{c_s \times 10/7 \times 2 \times 2 \times 100}{m \times f} \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

X——试样中维生素D_2（或D_3）的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

c_s——从标线得到的维生素 D_2（或 D_3）待测液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

f——回收率校正因子。

注： 试样中维生素 D 的含量以维生素 D_2 和 D_3 的含量总和计。

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

7.3 维生素 E 含量

维生素 E 含量按（3）计算：

$$X = \frac{c_s \times 10 / 2 \times 5 \times 100}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X——试样中维生素E（α-生育酚）的含量，单位为毫克每百克（ mg/100 g）；

c_s——从标准曲线得到的维生素 E 待测液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值，维生素A、E不得超过算术平均值的5%，维生素D不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

本标准检出限：维生素 A 为 1 μg/100 g、维生素 E 为 10.00 μg/100 g、维生素 D 为 0.20 μg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
标准溶液浓度校正方法

维生素A、D、E标准储备液配制后需要进行校正，具体操作如下：

分别取维生素A、D、E标准储备液若干微升，分别注入至含有3.00 mL乙醇的比色皿中，根据给定波长测定各维生素的吸光值，按表A.1给定的条件进行测定，通过下列公式计算出该维生素的浓度。

表A.1　各维生素吸光值的测定条件

标准品	加入标准储备液的量 （μL）	比吸光系数 $E_{cm}^{1\%}$	波长 λ（nm）
视黄醇（维生素A）	V	1835	325
α-生育酚（维生素E）	V	71	294
麦角钙化甾醇（维生素D_2）	V	485	264
胆钙化醇（维生素D_3）	V	462	264

浓度计算按式(4)：

$$C=\frac{A}{E}\times\frac{1}{100}\times\frac{3.00}{V\times10^{-3}} \quad \cdots\cdots(4)$$

式中：

C——维生素A、D、E浓度，单位为克每毫升（g/mL）；

A——维生素A、D、E的平均紫外吸光值；

V——加入标准储备液的量，单位为微升（μL）；

E——A、D、E维生素1 %比色光系数；

$\frac{3.00}{V\times10^{-3}}$——标准储备液稀释倍数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（资料性附录）
标准品液相色谱图

B.1 维生素 A、E、D_3、D_2标准品液相色谱图

维生素 A、E、D_3、D_2标准品液相色谱图见图 B.1～图 B.4。

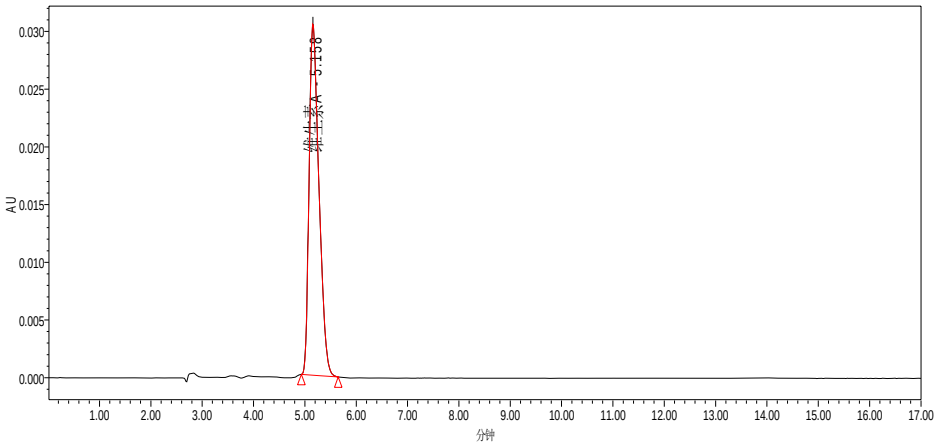


图 B.1　维生素A标准品液相色谱图

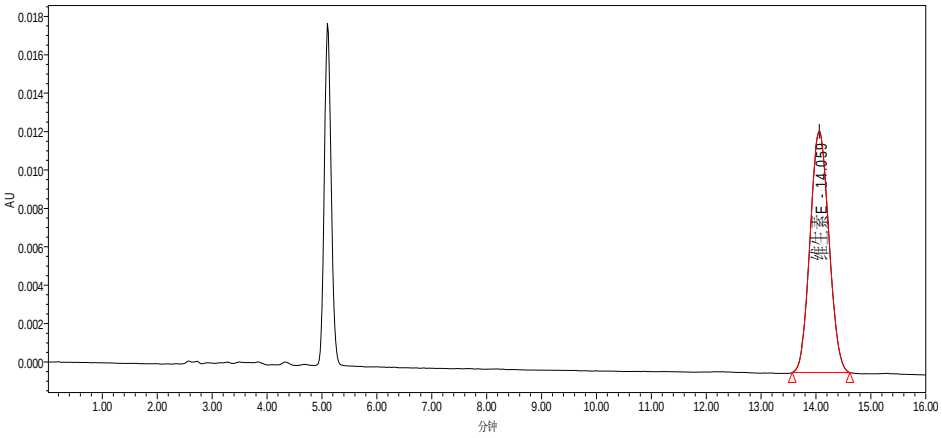


图 B.2　维生素 E 标准品液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

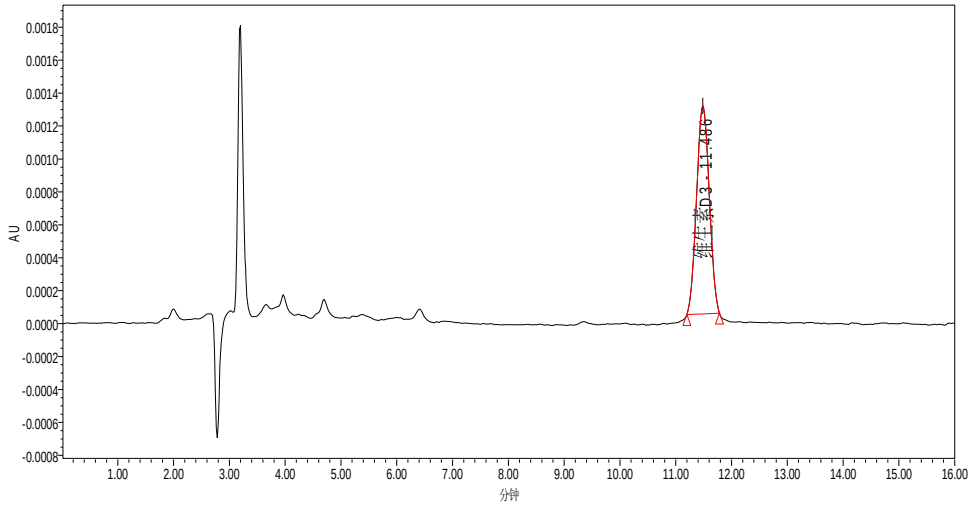


图 B.3　维生素D_3标准品液相色谱图

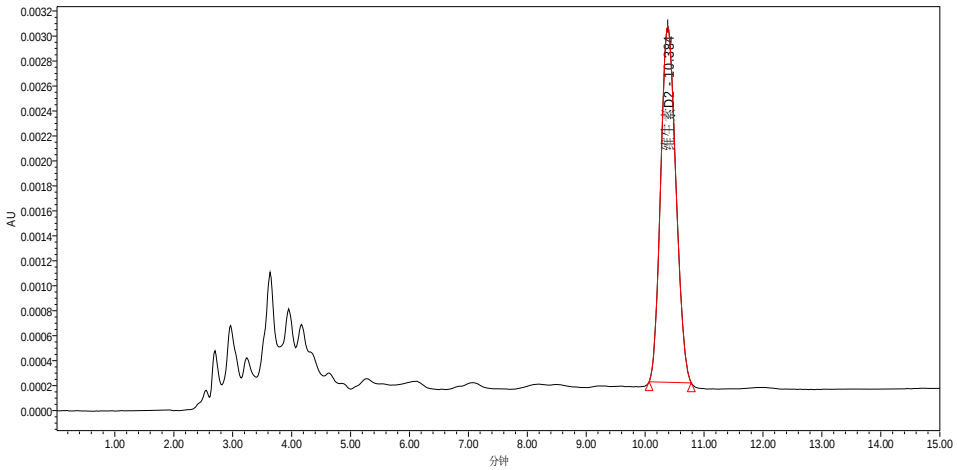


图 B.4　维生素 D_2 标准品液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.10—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus*

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 4789.10-2008《食品卫生微生物学检验　金黄色葡萄球菌检验》和GB/T 4789.37-2008《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌计数》。

本标准与 GB/T 4789.10-2008 和 GB/T 4789.37-2008 相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——修改了范围；

——规范了样品制备过程；

——增加了计算公式中系数 1.1 的解释；

——修改了附录 A 中胰酪胨大豆肉汤的名称，规范为 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤；

——增加了第二法金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板计数和第三法金黄色葡萄球菌 MPN 计数。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 是规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.10-84、GB 4789.10-1994、GB/T 4789.10-2003、GB/T 4789.10-2008。

——GB/T 4789.37-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　金黄色葡萄球菌检验

1　范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的检验方法。

本标准第一法适用于食品中金黄色葡萄球菌的定性检验；第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数；第三法适用于金黄色葡萄球菌含量较低而杂菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数。

2　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1　恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

2.2　冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.3　恒温水浴箱：37 ℃～65 ℃。

2.4　天平：感量 0.1 g。

2.5　均质器。

2.6　振荡器。

2.7　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

2.8　无菌锥形瓶：容量 100 mL、500 mL。

2.9　无菌培养皿：直径 90 mm。

2.10　注射器：0.5 mL。

2.11　pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

3　培养基和试剂

3.1　10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤：见附录 A 中 A.1。

3.2　7.5 %氯化钠肉汤：见附录 A 中 A.2。

3.3　血琼脂平板：见附录 A 中 A.3。

3.4　Baird-Parker 琼脂平板：见附录 A 中 A.4。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.5 脑心浸出液肉汤(BHI) ：见附录 A 中 A.5。

3.6 兔血浆：见附录 A 中 A.6。

3.7 稀释液：磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.7。

3.8 营养琼脂小斜面：见附录 A 中 A.8。

3.9 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.9。

3.10 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.10。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第一法　金黄色葡萄球菌定性检验

4　检验程序

金黄色葡萄球菌定性检验程序见图1。

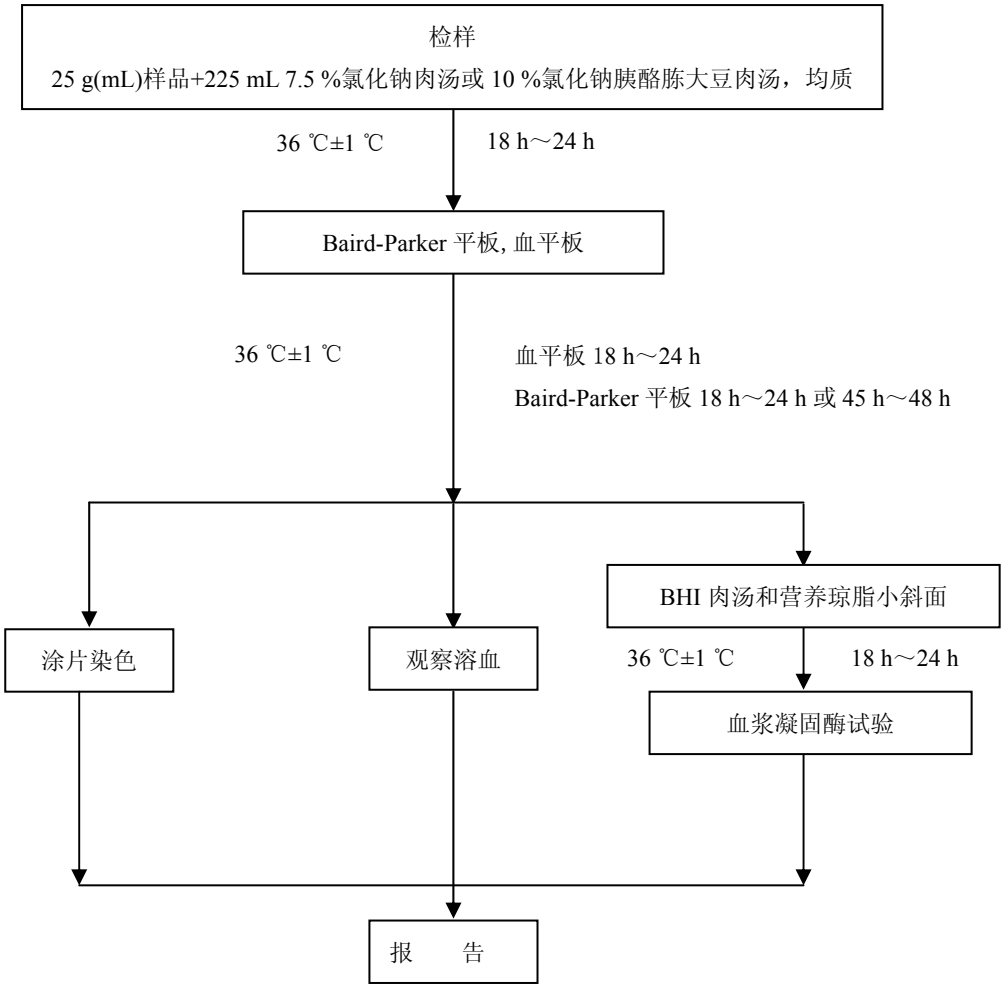


图1 金黄色葡萄球菌检验程序

5　操作步骤

5.1　样品的处理

称取 25 g 样品至盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质杯内，8000 r/min～10000 r/min 均质 1 min～2 min，或放入盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min～2 min。若样品为液态，吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中，振荡混匀。

5.2　增菌和分离培养

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.2.1 将上述样品匀液于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。金黄色葡萄球菌在 7.5%氯化钠肉汤中呈混浊生长，污染严重时在 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤内呈混浊生长。

5.2.2 将上述培养物，分别划线接种到 Baird-Parker 平板和血平板，血平板 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。Baird-Parker 平板 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h 或 45 h～48 h。

5.2.3 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上，菌落直径为 2 mm～3 mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度，偶然会遇到非脂肪溶解的类似菌落；但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能粗糙并干燥。在血平板上，形成菌落较大，圆形、光滑凸起、湿润、金黄色（有时为白色），菌落周围可见完全透明溶血圈。挑取上述菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

5.3 鉴定

5.3.1 染色镜检：金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌，排列呈葡萄球状，无芽胞，无荚膜，直径约为 0.5 μm～1 μm。

5.3.2 血浆凝固酶试验：挑取、Baird-Parker 平板或血平板上可疑菌落 1 个或以上，分别接种到 5 mL BHI 和营养琼脂小斜面，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

取新鲜配置兔血浆 0.5 mL，放入小试管中，再加入 BHI 培养物 0.2 mL～0.3 mL，振荡摇匀，置 36 ℃±1 ℃温箱或水浴箱内，每半小时观察一次，观察 6 h，如呈现凝固（即将试管倾斜或倒置时，呈现凝块）或凝固体积大于原体积的一半，被判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的肉汤培养物作为对照。也可用商品化的试剂，按说明书操作，进行血浆凝固酶试验。

结果如可疑，挑取营养琼脂小斜面的菌落到 5 mL BHI，36 ℃±1 ℃培养 18 h～48 h，重复试验。

5.4 葡萄球菌肠毒素的检验

可疑食物中毒样品或产生葡萄球菌肠毒素的金黄色葡萄球菌菌株的鉴定，应按附录B检测葡萄球菌肠毒素。

6 结果与报告

6.1 结果判定：符合 5.2.3、5.3，可判定为金黄色葡萄球菌。

6.2 结果报告：在 25 g（mL）样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第二法　金黄色葡萄球菌 Baird-Parker平板计数

7　检验程序

金黄色葡萄球菌平板计数程序见图2。

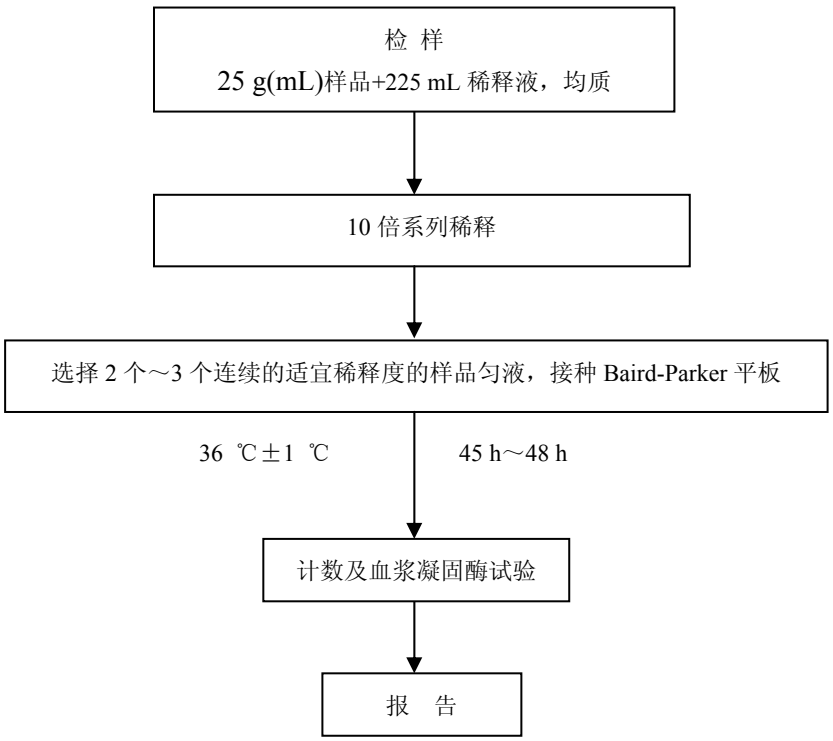


图 2 金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板法检验程序

8　操作步骤

8.1　样品的稀释

8.1.1 固体和半固体样品：称取25 g样品置盛有225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min～10000 r/min均质1 min～2 min，或置盛有225 mL稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min～2 min，制成1:10的样品匀液。

8.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取25 mL样品置盛有225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中，充分混匀，制成1:10的样品匀液。

8.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

8.1.4 按 8.1.3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

8.2　样品的接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2 个～3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别加

食品伙伴网http://www.foodmate.net

入三块Baird-Parker平板，然后用无菌L棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如Baird-Parker平板表面有水珠，可放在25 ℃～50 ℃的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

8.3 培养

8.3.1.1 在通常情况下，涂布后，将平板静置10 min，如样液不易吸收，可将平板放在培养箱36 ℃±1 ℃培养1 h；等样品匀液吸收后翻转平皿，倒置于培养箱，36 ℃±1 ℃培养，45 h～48 h。

8.4 典型菌落计数和确认

8.4.1 金黄色葡萄球菌在Baird-Parker平板上，菌落直径为2 mm～3 mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度，偶然会遇到非脂肪溶解的类似菌落；但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能粗糙并干燥。

8.4.2 选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板，且同一稀释度3个平板所有菌落数合计在20 CFU～200 CFU之间的平板，计数典型菌落数。如果：

a）只有一个稀释度平板的菌落数在20 CFU～200 CFU之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；

b） 最低稀释度平板的菌落数小于20 CFU且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；

c） 某一稀释度平板的菌落数大于200 CFU且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

d） 某一稀释度平板的菌落数大于200 CFU且有典型菌落，且下一稀释度平板上有典型菌落，但其平板上的菌落数不在20 CFU～200 CFU之间，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

以上按公式（1）计算。

e） 2个连续稀释度的平板菌落数均在20 CFU～200 CFU之间，按公式（2）计算。

8.4.3 从典型菌落中任选5个菌落（小于5个全选），分别按5.3.2做血浆凝固酶试验。

9 结果计算：

公式（1）：

$$T = \frac{AB}{Cd} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A——某一稀释度典型菌落的总数；

B——某一稀释度血浆凝固酶阳性的菌落数；

C——某一稀释度用于血浆凝固酶试验的菌落数；

d——稀释因子。

公式（2）：

$$T = \frac{A1B1/C1 + A2B2/C2}{1.1d} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

$A1$——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

$A2$——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

$B1$——第一稀释度（低稀释倍数）血浆凝固酶阳性的菌落数；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

*B*2——第二稀释度（高稀释倍数）血浆凝固酶阳性的菌落数；
*C*1——第一稀释度（低稀释倍数）用于血浆凝固酶试验的菌落数；
*C*2——第二稀释度（高稀释倍数）用于血浆凝固酶试验的菌落数；
1.1——计算系数；
d ——稀释因子（第一稀释度）。

10 结果与报告

根据Baird-Parker平板上金黄色葡萄球菌的典型菌落数，按9中公式计算，报告每g（mL）样品中金黄色葡萄球菌数，以CFU/g(mL)表示；如T值为0，则以小于1乘以最低稀释倍数报告。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第三法　金黄色葡萄球菌MPN计数

11　检验程序

金黄色葡萄球菌MPN计数程序见图3。

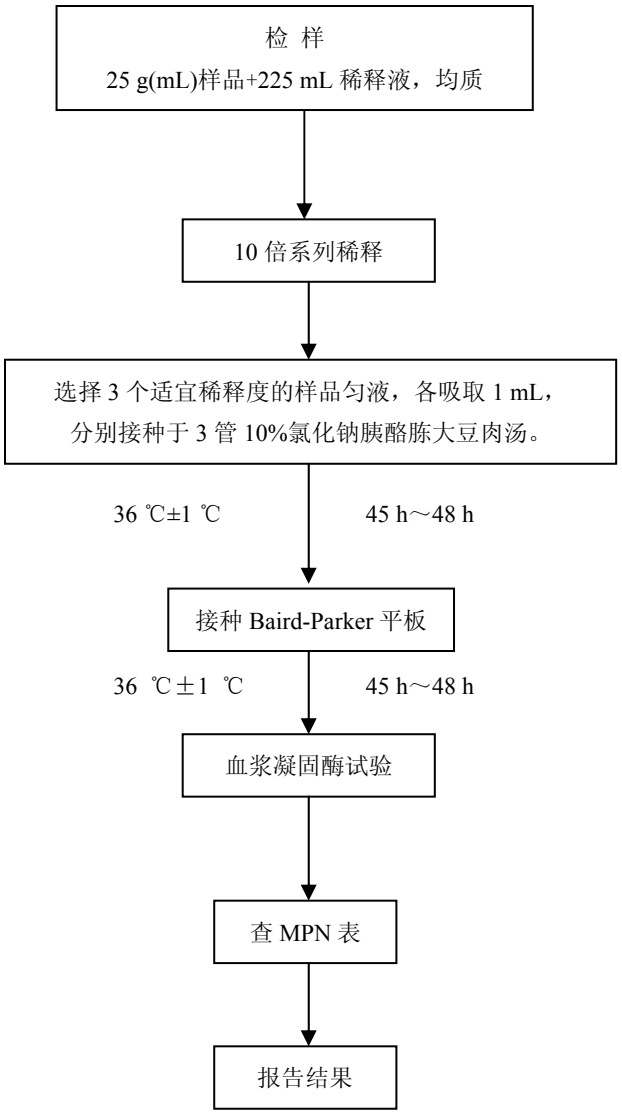


图3 金黄色葡萄球菌MPN法检验程序

12　操作步骤

12.1　样品的稀释

按8.1进行。

12.2　接种和培养

12.2.1　根据对样品污染状况的估计，选择 3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液接种到 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤管，每个稀释度接种 3 管，将上述接种物于 36 ℃±1 ℃培养 45 h～48 h。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

12.2.2 用接种环从有细菌生长的各管中，移取1环，分别接种Baird-Parker平板，36 ℃±1 ℃培养45 h～48 h。

12.3 典型菌落确认

12.3.1 见8.4.1。

12.3.2 从典型菌落中至少挑取1个菌落接种到BHI肉汤和营养琼脂斜面，36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h。进行血浆凝固酶试验，见5.3.2。

13 结果与报告

计算血浆凝固酶试验阳性菌落对应的管数，查MPN检索表（见附录C），报告每g(mL)样品中金黄色葡萄球菌的最可能数，以MPN/g（mL）表示。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤

A.1.1 成分

胰酪胨（或胰蛋白胨）	17.0 g
植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）	3.0 g
氯化钠	100.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
丙酮酸钠	10.0 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.3±0.2	

A.1.2 制法

将上述成分混合，加热，轻轻搅拌并溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2 7.5%氯化钠肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	75 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4	

A.2.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.3 血琼脂平板

A.3.1 成分

豆粉琼脂（pH7.4～7.6）	100 mL
脱纤维羊血（或兔血）	5 mL～10 mL

A.3.2 制法

加热溶化琼脂，冷却至 50 ℃，以无菌操作加入脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。

A.4 Baird－Parker琼脂平板

A.4.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	1.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘氨酸	12.0 g
氯化锂（$LiCl·6H_2O$）	5.0 g

食品伙伴网http://www.foodmate.net

琼脂	20.0 g
蒸馏水	950 mL
pH 7.0±0.2	

A.4.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与经过除菌过滤的 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合，保存于冰箱内。

A.4.3 制法

将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，调节 pH。分装每瓶 95 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50 ℃，每 95 mL 加入预热至 50 ℃的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

A.5 脑心浸出液肉汤(BHI)

A.5.1 成分

胰蛋白质胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸出液	500 mL
pH 7.4±0.2	

A.5.2 制法

加热溶解，调节 pH，分装 16 mm×160 mm 试管，每管 5 mL 置 121 ℃，15 min 灭菌。

A.6 兔血浆

取柠檬酸钠 3.8 g，加蒸馏水 100 mL,溶解后过滤，装瓶，121 ℃高压灭菌 15 min。

兔血浆制备：取 3.8%柠檬酸钠溶液一份，加兔全血四份，混好静置 (或以 3000 r/min 离心 30 min)，使血液细胞下降，即可得血浆。

A.7 磷酸盐缓冲液

A.7.1 成分：

磷酸二氢钾（KH_2PO_4）	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 7.2	

A.7.2 制法：

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.2，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 ℃高压灭菌15 min。

A.8 营养琼脂小斜面

A.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g～20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2～7.4	

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入15%氢氧化钠溶液约2 mL调节pH至7.2～7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化，分装13 mm×130 mm管，121 ℃高压灭菌15 min。

A.9 革兰氏染色液

A.9.1 结晶紫染色液

A.9.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95％乙醇	20.0 mL
1％草酸铵水溶液	80.0 mL

A.9.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.9.2 革兰氏碘液

A.9.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.9.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL。

A.9.3 沙黄复染液

A.9.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95％乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.9.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.9.4 染色法

a) 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。
b) 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。
c) 滴加 95％乙醇脱色约 15 s～30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。
d) 滴加复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

A.10 无菌生理盐水

A.10.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 ℃高压灭菌15 min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（规范性附录）
葡萄球菌肠毒素检验

B.1 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，试验用水应符合GB/T 6682对一级水的规定。

B.1.1 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒。

B.1.2 pH 试纸，范围在 3.5～8.0，精度 0.1。

B.1.3 0.25 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液：将 121.1g 的 Tris 溶解到 800mL 的去离子水中，待温度冷至室温后，加 42 mL 浓 HCl，调 pH 值至 8.0。

B.1.4 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液：称取 $NaH_2PO_4·H_2O$ 0.55g（或 $NaH_2PO_4·2H_2O$ 0.62g）、$Na_2HPO_4·2H_2O$ 2.85g（或 $Na_2HPO_4·12H_2O$ 5.73g）、NaCl 8.7g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中，充分混匀即可。

B.1.5 庚烷。

B.1.6 10%次氯酸钠溶液。

B.1.7 肠毒素产毒培养基

B.1.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
胰消化酪蛋白	200 mg(氨基酸)
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钙	0.1 g
硫酸镁	0.2 g
菸酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.2～7.4	

B.1.7.2 制法

将所有成分混于水中，溶解后调节 pH，121℃高压灭菌 30min。

B.1.8 营养琼脂

B.1.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g～20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.1.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15%氢氧化钠溶液约 2mL，校正 pH 至 7.2～7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，121℃高压灭菌 15min。

B.2 仪器和设备

B.2.1 电子天平：感量 0.01g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.2.2 均质器。

B.2.3 离心机：转速 3000 g～5000 g。

B.2.4 离心管：50 mL。

B.2.5 滤器：滤膜孔径 0.2 μm。

B.2.6 微量加样器:20 μL～200 μL、200 μL～1000 μL。

B.2.7 微量多通道加样器:50 μL～300 μL。

B.2.8 自动洗板机(可选择使用)。

B.2.9 酶标仪：波长 450 nm。

B.3 原理

本方法可用 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型酶联免疫吸附试剂盒完成。本方法测定的基础是酶联免疫吸附反应（ELISA）。96 孔酶标板的每一个微孔条的 A~E 孔分别包被了 A、B、C、D、E 型葡萄球菌肠毒素抗体，H 孔为阳性质控，已包被混合型葡萄球菌肠毒素抗体，F 和 G 孔为阴性质控，包被了非免疫动物的抗体。样品中如果有葡萄球菌肠毒素，游离的葡萄球菌肠毒素则与各微孔中包被的特定抗体结合，形成抗原抗体复合物，其余未结合的成分在洗板过程中被洗掉；抗原抗体复合物再与过氧化物酶标记物（二抗）结合，未结合上的酶标记物在洗板过程中被洗掉；加入酶底物和显色剂并孵育，酶标记物上的酶催化底物分解，使无色的显色剂变为蓝色；加入反应终止液可使颜色由蓝变黄，并终止了酶反应；以 450 nm 波长的酶标仪测量微孔溶液的吸光度值，样品中的葡萄球菌肠毒素与吸光度值成正比。

B.4 检测步骤

B.4.1 从分离菌株培养物中检测葡萄球菌肠毒素方法

待测菌株接种营养琼脂斜面（试管18 mm×180 mm）37 ℃培养24 h，用5 mL生理盐水洗下菌落，倾入60 mL产毒培养基中，每个菌种种一瓶，37 ℃振荡培养48 h，振速为100 次/min，吸出菌液离心，8000 r/min 20 min，加热100 ℃，10 min，取上清液,取100 μL稀释后的样液进行试验。

B.4.2 从食品中提取和检测葡萄球菌毒素方法

B.4.2.1 乳和乳粉

将 25 g 乳粉溶解到 125 mL、0.25 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液中，混匀后同液体乳一样按以下步骤制备。将乳于 15 ℃，3500 g 离心 10 min。将表面形成的一层脂肪层移走，变成脱脂乳。用蒸馏水对其进行稀释（1：20）。取 100μL 稀释后的样液进行试验。

B.4.2.2 脂肪含量不超过 40%的食品

称取 10 g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15℃，3500g 离心 10 min。必要时，移去上面脂肪层。取上清液进行过滤除菌。取 100 μL 的滤出液进行试验。

B.4.2.3 脂肪含量超过 40%的食品

称取 10 g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 ℃，3500 g 离心 10 min。吸取 5 mL 上层悬浮液，转移到另外一个离心管中，再加入 5 mL 的庚烷，充分混匀 5 min。于 15 ℃，3500 g 离心 5 min。将上部有机相（庚烷层）全部弃去，注意该过程中不要残留庚烷。将下部水相层进行过滤除菌。取 100 μL 的滤出液进行试验。

B.4.2.4 其它食品可酌情参考上述食品处理方法。

B.4.3 检测

B.4.3.1 所有操作均应在室温（20 ℃~25 ℃）下进行，A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温方可使用。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头，用过的吸头以及废液要浸泡到 10 %次氯酸钠溶液中过夜。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.4.3.2　将所需数量的微孔条插入框架中（一个样品需要一个微孔条）。将样品液加入微孔条的 A~G 孔，每孔 100 μL。H 孔加 100 μL 的阳性对照，用手轻拍微孔板充分混匀，用粘胶纸封住微孔以防溶液挥发，置室温下孵育 1 h。

B.4.3.3　将孔中液体倾倒至含 10 %次氯酸钠溶液的容器中，并在吸水纸上拍打几次以确保孔内不残留液体。每孔用多通道加样器注入 250 μL 的洗液，再倾倒掉并在吸水纸上拍干。重复以上洗板操作 4 次。本步骤也可由自动洗板机完成。

B.4.3.4　每孔加入 100μL 的酶标抗体，用手轻拍微孔板充分混匀，置室温下孵育 1 h。

B.4.3.5　重复 B.4.3.3 的洗板程序。

B.4.3.6　加 50μL 的 TMB 底物和 50μL 的发色剂至每个微孔中，轻拍混匀，室温黑暗避光处孵育 30 min。

B.4.3.7　加入 100μL 的 2 mol/L 硫酸终止液，轻拍混匀，30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长条件下测量每个微孔溶液的 OD 值。

B.4.4　结果的计算和表述

B.4.4.1　质量控制

测试结果阳性质控的 OD 值要大于 0.5，阴性质控的 OD 值要小于 0.3，如果不能同时满足以上要求，测试的结果不被认可。对阳性结果要排除内源性过氧化物酶的干扰。

B.4.4.2　临界值的计算

每一个微孔条的 F 孔和 G 孔为阴性质控，两个阴性质控 OD 值的平均值加上 0.15 为临界值。

示例：阴性质控 1=0.08

阴性质控 2=0.10

平均值=0.09

临界值=0.09+0.15=0.24

B.4.4.3 结果表述

OD 值小于临界值的样品孔判为阴性，表述为样品中未检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素；OD 值大于或等于临界值的样品孔判为阳性，表述为样品中检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素。

B.5　生物安全

因样品中不排除有其它潜在的传染性物质存在，所以要严格按照 GB19489 对废弃物进行处理。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录C
（规范性附录）
金黄色葡萄球菌最可能数（MPN）检索表

C.1 金黄色葡萄球菌最可能数（MPN）的检索见表

每g(mL)检样中金黄色葡萄球菌最可能数（MPN）的检索见表C.1。

表C.1 金黄色葡萄球菌最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1：本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2：表内所列检样量如改用1 g (mL)、0.1 g(mL)和0.01 g(mL)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.15—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

National food safety standard

Food microbiological examination: Enumeration of moulds and yeasts

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准自实施之日起代替 GB/T 4789.15-2003《食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数》。

本标准与 GB/T 4789.15-2003 相比，主要修改如下：

——修改了范围；

——修改了检验程序和操作步骤；

——修改了培养基和试剂；

——修改了设备和材料；

——修改了附录。

本标准的附录 A 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.15-1984、GB 4789.15-1994、GB/T 4789.15-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　霉菌和酵母计数

1　范围

本标准规定了食品中霉菌和酵母菌（moulds and yeasts）的计数方法。

本标准适用于各类食品中霉菌和酵母菌的计数。

2　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1　冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.2　恒温培养箱：　28 ℃±1 ℃。

2.3　均质器。

2.4　恒温振荡器。

2.5　显微镜：10×～100×。

2.6　电子天平：感量 0.1 g。

2.7　无菌锥形瓶:容量 500 mL、250 mL。

2.8　无菌广口瓶：500 mL。

2.9　无菌吸管：1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。

2.10 无菌平皿：直径 90 mm。

2.11 无菌试管：10 mm×75 mm。

2.12 无菌牛皮纸袋、塑料袋。

3　培养基和试剂

3.1　马铃薯-葡萄糖-琼脂培养基：见附录 A 中 A.1。

3.2　孟加拉红培养基：见附录 A 中 A.2。

4　检验程序

霉菌和酵母计数的检验程序见图1。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

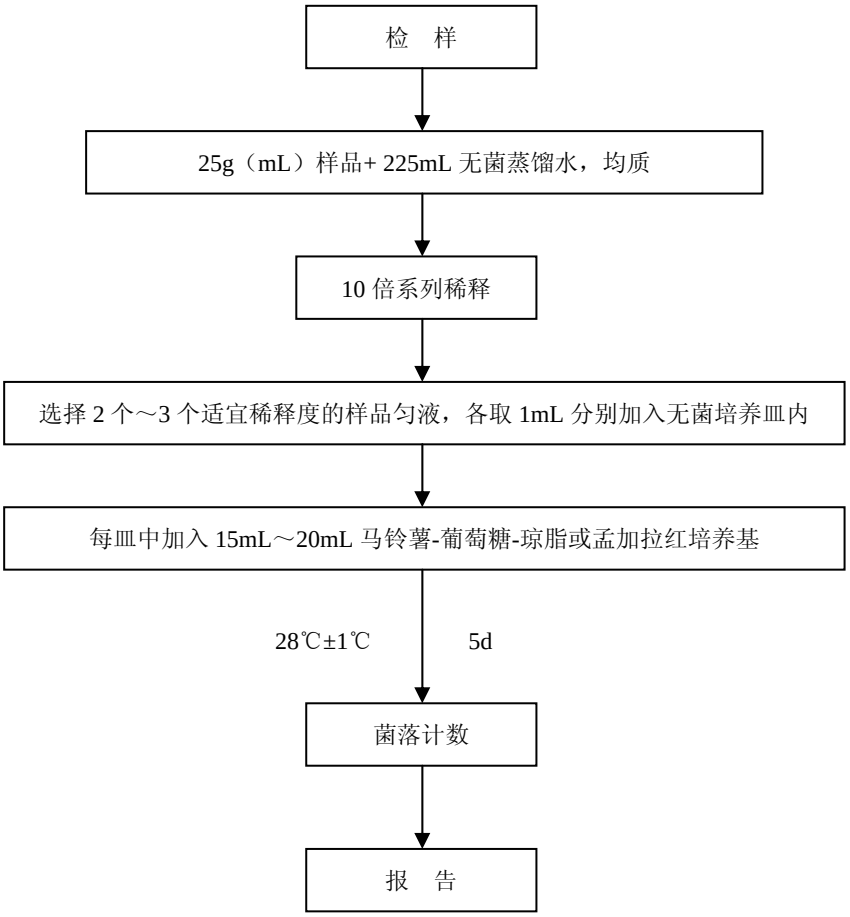


图 1 霉菌和酵母计数的检验程序

5　操作步骤

5.1　样品的稀释

5.1.1　固体和半固体样品：称取 25 g 样品至盛有 225 mL 灭菌蒸馏水的锥形瓶中，充分振摇，即为 1:10 稀释液。或放入盛有 225 mL 无菌蒸馏水的均质袋中，用拍击式均质器拍打 2min，制成 1:10 的样品匀液。

5.1.2　液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 无菌蒸馏水的锥形瓶（可在瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

5.1.3　取 1 mL 1:10 稀释液注入含有 9 mL 无菌水的试管中，另换一支 1 mL 无菌吸管反复吹吸，此液为 1:100 稀释液。

5.1.4　按 5.1.3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管。

5.1.5　根据对样品污染状况的估计，选择 2 个～3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液于 2 个无菌平皿内。同时分别取 1 mL 样品稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照。

5.1.6　及时将 15 mL～20 mL 冷却至 46 ℃的马铃薯-葡萄糖-琼脂或孟加拉红培养基（可放置于 46℃±1℃恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

5.2　培养

食品伙伴网http://www.foodmate.net

待琼脂凝固后，将平板倒置，28℃±1℃培养 5d，观察并记录。

5.3 菌落计数

肉眼观察，必要时可用放大镜，记录各稀释倍数和相应的霉菌和酵母数。以菌落形成单位（colony forming units，CFU）表示。

选取菌落数在 10 CFU～150 CFU 的平板，根据菌落形态分别计数霉菌和酵母数。霉菌蔓延生长覆盖整个平板的可记录为多不可计。菌落数应采用两个平板的平均数。

6 结果与报告

6.1 计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数计算。

6.1.2 若所有平板上菌落数均大于 150 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

6.1.3 若所有平板上菌落数均小于 10 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

6.1.4 若所有稀释度平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算；如为原液，则以小于 1 计数。

6.2 报告

6.2.1 菌落数在 100 以内时，按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字报告。

6.2.2 菌落数大于或等于 100 时，前 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字。

6.2.3 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告，报告或分别报告霉菌和/或酵母数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 马铃薯-葡萄糖-琼脂

A.1.1 成分

马铃薯(去皮切块)	300 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	20.0 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

A.1.2 制法

将马铃薯去皮切块，加 1000mL 蒸馏水，煮沸 10 min～20 min。用纱布过滤，补加蒸馏水至 1000 mL。加入葡萄糖和琼脂，加热溶化，分装后，121 ℃灭菌 20 min。倾注平板前，用少量乙醇溶解氯霉素加入培养基中

A.2 孟加拉红培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
硫酸镁（无水）	0.5 g
琼脂	20.0 g
孟加拉红	0.033 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

A.2.2 制法

上述各成分加入蒸馏水中，加热溶化，补足蒸馏水至 1000 mL，分装后，121℃灭菌 20 min。倾注平板前，用少量乙醇溶解氯霉素加入培养基中。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（资料性附录）
霉菌直接镜检计数法

常用的为郝氏霉菌计测法，本方法适用于番茄酱罐头。

B.1 设备和材料

B.1.1 折光仪。

B.1.2 显微镜。

B.1.3 郝氏计测玻片：具有标准计测室的特制玻片。

B.1.4 盖玻片。

B.1.5 测微器：具标准刻度的玻片。

B.2 操作步骤

B.2.1 检样的制备：取定量检样,加蒸馏水稀释至折光指数为 1.3447～1.3460（即浓度为 7.9%～8.8%），备用。

B.2.2 显微镜标准视野的校正：将显微镜按放大率 90～125 倍调节标准视野，使其直径为 1.382 mm。

B.2.3 涂片：洗净郝氏计测玻片，将制好的标准液，用玻璃棒均匀的摊布于计测室，以备观察。

B.2.4 观测：将制好之载玻片放于显微镜标准视野下进行霉菌观测，一般每一检样观察 50 个视野，同一检样应由两人进行观察。

B.2.5 结果与计算：在标准视野下，发现有霉菌菌丝其长度超过标准视野（1.382mm)的1/6或三根菌丝总长度超过标准视野的1/6（即测微器的一格）时即为阳性（+），否则为阴性（-），按100个视野计，其中发现有霉菌菌丝体存在的视野数，即为霉菌的视野百分数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.18—2010

食品安全国家标准
食品微生物学检验 乳与乳制品检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 4789.18-2003《食品卫生微生物学检验　乳与乳制品检验》。

本标准与 GB/T 4789.18-2003 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中英文名称；

——修改了“范围”和“规范性引用文件”；

——修改了采样方案和各类乳制品的处理方法。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

——GB 4789.18-1984、GB 4789.18-1994、GB/T 4789.18-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　乳与乳制品检验

1　范围

本标准适用于乳与乳制品的微生物学检验。

2　规范性引用文件

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

3　设备和材料

3.1　采样工具

采样工具应使用不锈钢或其他强度适当的材料，表面光滑，无缝隙，边角圆润。采样工具应清洗和灭菌，使用前保持干燥。采样工具包括搅拌器具、采样勺、匙、切割丝、刀具（小刀或抹刀）、采样钻等。

3.2　样品容器

样品容器的材料（如玻璃、不锈钢、塑料等）和结构应能充分保证样品的原有状态。容器和盖子应清洁、无菌、干燥。样品容器应有足够的体积，使样品可在测试前充分混匀。样品容器包括采样袋、采样管、采样瓶等。

3.3　其他用品

包括温度计、铝箔、封口膜、记号笔、采样登记表等。

3.4　实验室检验用品

3.4.1　常规检验用品按 GB 4789.1 执行。

3.4.2　微生物指标菌检验分别按 GB 4789.2、GB 4789.3、GB 4789.15 执行。

3.4.3　致病菌检验分别按 GB 4789.4、GB 4789.10、GB 4789.30 和 GB 4789.40 执行。

3.4.4　双歧杆菌和乳酸菌检验分别按 GB/T 4789.34、GB 4789.35 执行。

4　采样方案

样品应当具有代表性。采样过程采用无菌操作，采样方法和采样数量应根据具体产品的特点和产品标准要求执行。样品在保存和运输的过程中，应采取必要的措施防止样品中原有微生物的数量变化，保持样品的原有状态。

4.1　生乳的采样

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.1.1 样品应充分搅拌混匀，混匀后应立即取样，用无菌采样工具分别从相同批次（此处特指单体的贮奶罐或贮奶车）中采集 n 个样品，采样量应满足微生物指标检验的要求。

4.1.2 具有分隔区域的贮奶装置，应根据每个分隔区域内贮奶量的不同，按比例从中采集一定量经混合均匀的代表性样品，将上述奶样混合均匀采样。

4.2 液态乳制品的采样

适用于巴氏杀菌乳、发酵乳、灭菌乳、调制乳等。取相同批次最小零售原包装，每批至少取 n 件。

4.3 半固态乳制品的采样

4.3.1 炼乳的采样

适用于淡炼乳、加糖炼乳、调制炼乳等。

4.3.1.1 原包装小于或等于 500 g（mL）的制品：取相同批次的最小零售原包装，每批至少取 n 件。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.1.2 原包装大于 500 g（mL）的制品（再加工产品，进出口）：采样前应摇动或使用搅拌器搅拌，使其达到均匀后采样。如果样品无法进行均匀混合，就从样品容器中的各个部位取代表性样。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.2 奶油及其制品的采样

适用于稀奶油、奶油、无水奶油等。

4.3.2.1 原包装小于或等于 1000 g（mL）的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.2.2 原包装大于 1000 g（mL）的制品：采样前应摇动或使用搅拌器搅拌，使其达到均匀后采样。对于固态制品，用无菌抹刀除去表层产品，厚度不少于 5 mm。将洁净、干燥的采样钻沿包装容器切口方向往下，匀速穿入底部。当采样钻到达容器底部时，将采样钻旋转 180°，抽出采样钻并将采集的样品转入样品容器。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4 固态乳制品采样

适用于干酪、再制干酪、乳粉、乳清粉、乳糖和酪乳粉等。

4.4.1 干酪与再制干酪的采样

4.4.1.1 原包装小于或等于 500 g 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.1.2 原包装大于 500 g 的制品：根据干酪的形状和类型，可分别使用下列方法：（1）在距边缘不小于 10 cm 处，把取样器向干酪中心斜插到一个平表面，进行一次或几次。（2）把取样器垂直插入一个面，并穿过干酪中心到对面。（3）从两个平面之间，将取样器水平插入干酪的竖直面，插向干酪中心。（4）若干酪是装在桶、箱或其它大容器中，或是将干酪制成压紧的大块时，将取样器从容器顶斜穿到底进行采样。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.2 乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉的采样

适用于乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉等。

4.4.2.1 原包装小于或等于500 g的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于5倍或以上检验单位的样品。

4.4.2.2 原包装大于500 g的制品：将洁净、干燥的采样钻沿包装容器切口方向往下，匀速穿入底部。当采样钻到达容器底部时，将采样钻旋转180°，抽出采样钻并将采集的样品转入样品容器。采样量不小于5倍或以上检验单位的样品。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5 检样的处理

5.1 乳及液态乳制品的处理

将检样摇匀，以无菌操作开启包装。塑料或纸盒（袋）装，用75 %酒精棉球消毒盒盖或袋口，用灭菌剪刀切开；玻璃瓶装，以无菌操作去掉瓶口的纸罩或瓶盖，瓶口经火焰消毒。用灭菌吸管吸取25 mL（液态乳中添加固体颗粒状物的，应均质后取样）检样，放入装有225 mL灭菌生理盐水的锥形瓶内，振摇均匀。

5.2 半固态乳制品的处理

5.2.1 炼乳

清洁瓶或罐的表面，再用点燃的酒精棉球消毒瓶或罐口周围，然后用灭菌的开罐器打开瓶或罐，以无菌手续称取25 g检样, 放入预热至45 ℃的装有225 mL灭菌生理盐水（或其他增菌液）的锥形瓶中，振摇均匀。

5.2.2 稀奶油、奶油、无水奶油等

无菌操作打开包装，称取25 g检样, 放入预热至45 ℃的装有225 mL灭菌生理盐水（或其他增菌液）的锥形瓶中，振摇均匀。从检样融化到接种完毕的时间不应超过30 min。

5.3 固态乳制品的处理

5.3.1 干酪及其制品

以无菌操作打开外包装，对有涂层的样品削去部分表面封蜡，对无涂层的样品直接经无菌程序用灭菌刀切开干酪，用灭菌刀（勺）从表层和深层分别取出有代表性的适量样品，磨碎混匀，称取25 g检样，放入预热到45 ℃的装有225 mL灭菌生理盐水（或其他稀释液）的锥形瓶中，振摇均匀。充分混合使样品均匀散开（1 min～3 min），分散过程时温度不超过40 ℃。尽可能避免泡沫产生。

5.3.2 乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉

取样前将样品充分混匀。罐装乳粉的开罐取样法同炼乳处理，袋装奶粉应用 75%酒精的棉球涂擦消毒袋口, 以无菌手续开封取样。称取检样 25 g，加入预热到 45 ℃盛有 225 mL 灭菌生理盐水等稀释液或增菌液的锥形瓶内（可使用玻璃珠助溶），振摇使充分溶解和混匀。

对于经酸化工艺生产的乳清粉，应使用pH 8.4±0.2的磷酸氢二钾缓冲液稀释。对于含较高淀粉的特殊配方乳粉，可使用α-淀粉酶降低溶液粘度，或将稀释液加倍以降低溶液粘度。

5.3.3 酪蛋白和酪蛋白酸盐

以无菌操作，称取25 g检样，按照产品不同，分别加入225 mL灭菌生理盐水等稀释液或增菌液。在对粘稠的样品溶液进行梯度稀释时，应在无菌条件下反复多次吹打吸管，尽量将粘附在吸管内壁的样品转移到溶液中。

5.3.3.1 酸法工艺生产的酪蛋白：使用磷酸氢二钾缓冲液并加入消泡剂，在pH 8.4±0.2的条件下溶解样品。

5.3.3.2 凝乳酶法工艺生产的酪蛋白：使用磷酸氢二钾缓冲液并加入消泡剂，在pH 7.5±0.2的条件下溶解样品，室温静置15 min。必要时在灭菌的匀浆袋中均质2 min，再静置5 min后检测。

5.3.3.3 酪蛋白酸盐：使用磷酸氢二钾缓冲液在pH 7.5±0.2的条件下溶解样品。

6 检验方法

6.1 菌落总数：按 GB 4789.2 检验。

6.2 大肠菌群：按 GB 4789.3 中的直接计数法计数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.3 沙门氏菌：按 GB 4789.4 检验。

6.4 金黄色葡萄球菌：按 GB 4789.10 检验。

6.5 霉菌和酵母：按 GB 4789.15 计数。

6.6 单核细胞增生李斯特氏菌：按 GB 4789.30 检验。

6.7 双歧杆菌：按 GB/T 4789.34 检验。

6.8 乳酸菌：按 GB 4789.35 检验。

6.9 阪崎肠杆菌：按GB 4789.40检验。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.30—2010

食品安全国家标准
食品微生物学检验
单核细胞增生李斯特氏菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 4789.30-2008《食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.30-2008 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中英文名称；

——删除“第二法　全自动酶链荧光免疫分析仪筛选法”；

——删除“第三法　全自动病原菌检测系统筛选法”。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准所代替标准的历年版本发布情况为：

——GB 4789.30-1994、GB/T 4789.30-2003、GB/T 4789.30-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　单核细胞增生李斯特氏菌检验

1　范围

本标准规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检验方法。

本标准适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

2　设备和材料

除微生物实验室常规无菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1　冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.2　恒温培养箱：30 ℃±1 ℃、36 ℃±1 ℃。

2.3　均质器。

2.4　显微镜：10×～100×。

2.5　电子天平：感量 0.1 g 。

2.6　锥形瓶：100 mL、500 mL。

2.7　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.8　无菌平皿：直径 90 mm。

2.9　无菌试管：16 mm×160 mm.。

2.10　离心管：30 mm×100 mm。

2.11　无菌注射器：1 mL。

2.12　金黄色葡萄球菌（ATCC25923）。

2.13　马红球菌（*Rhodococcus equi*）。

2.14　小白鼠：16 g～18 g。

2.15　全自动微生物生化鉴定系统。

3　培养基和试剂

3.1　含 0.6 %酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤（TSB-YE）：见附录 A 中 A.1。

3.2　含 0.6 %酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂（TSA-YE）：见附录 A 中 A.2。

3.3　李氏增菌肉汤 LB（LB_1，LB_2）：见附录 A 中 A.3。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.4 1 %盐酸吖啶黄（acriflavine HCl）溶液：见附录 A 中 A.3.2.1。

3.5 1 %萘啶酮酸钠盐（naladixic acid）溶液：见附录 A 中 A.3.2.1。

3.6 PALCAM 琼脂：见附录 A 中 A.4。

3.7 革兰氏染液：见附录 A 中 A.5。

3.8 SIM 动力培养基：见附录 A 中 A.6。

3.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红（MR）和 V-P 试验用]：见附录 A 中 A.7。

3.10 5 %～8 %羊血琼脂：见附录 A 中 A.8。

3.11 糖发酵管：见附录 A 中 A.9。

3.12 过氧化氢酶试验：见附录 A 中 A.10。

3.13 李斯特氏菌显色培养基。

3.14 生化鉴定试剂盒。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4. 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。

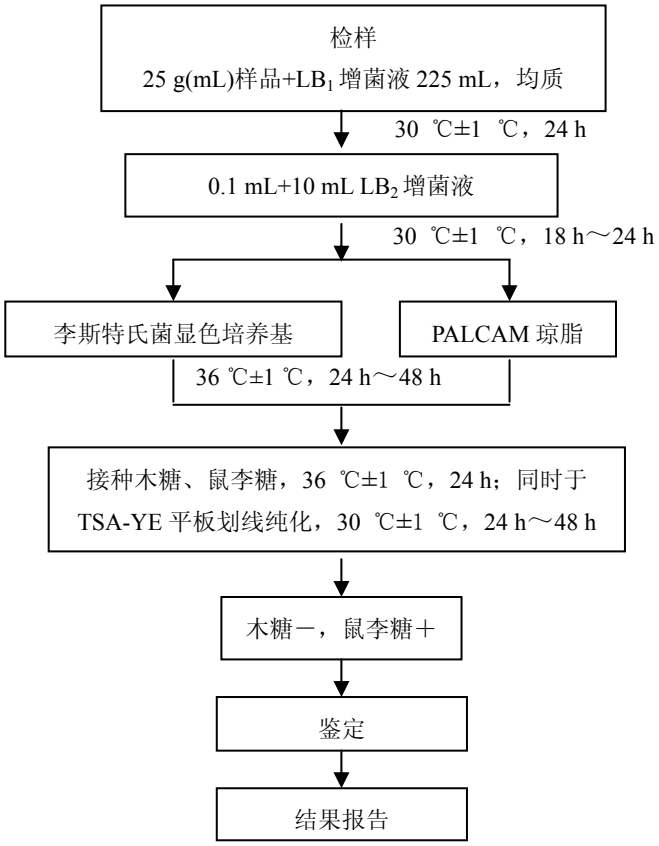


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取样品 25 g（mL）加入到含有 225 mL LB_1 增菌液的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1 min～2 min；或放入盛有 225 mL LB_1 增菌液的均质杯中，8000 r/min～10000 r/min 均质 1 min～2 min。于 30 ℃±1 ℃培养 24 h，移取 0.1 mL，转种于 10 mL LB_2 增菌液内，于 30 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

5.2 分离

取 LB_2 二次增菌液划线接种于 PALCAM 琼脂平板和李斯特氏菌显色培养基上，于 36 ℃±1 ℃培养 24 h～48 h，观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落，周围有棕黑色水解圈，有些菌落有黑色凹陷；典型菌落在李斯特氏菌显色培养基上的特征按照产品说明进行判定。

5.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 5 个以上典型或可疑菌落，分别接种在木糖、鼠李糖发酵管，于 36 ℃±1 ℃培养 24 h；同时在 TSA-YE 平板上划线纯化，于 30 ℃±1 ℃培养 24 h～48 h。选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.4 鉴定

5.4.1 染色镜检：李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌，大小为（0.4 μm～0.5 μm）×（0.5 μm～2.0 μm）；用生理盐水制成菌悬液，在油镜或相差显微镜下观察，该菌出现轻微旋转或翻滚样的运动。

5.4.2 动力试验：李斯特氏菌有动力，呈伞状生长或月牙状生长。

5.4.3 生化鉴定：挑取纯培养的单个可疑菌落，进行过氧化氢酶试验，过氧化氢酶阳性反应的菌落继续进行糖发酵试验和 MR-VP 试验。单核细胞增生李斯特氏菌的主要生化特征见表 1。

5.4.4 溶血试验：将羊血琼脂平板底面划分为 20 个～25 个小格，挑取纯培养的单个可疑菌落刺种到血平板上，每格刺种一个菌落，并刺种阳性对照菌(单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌)和阴性对照菌(英诺克李斯特氏菌)，穿刺时尽量接近底部，但不要触到底面，同时避免琼脂破裂，36 ℃±1 ℃培养 24 h～48 h，于明亮处观察，单增李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生狭小的透明溶血环，英诺克李斯特氏菌无溶血环，伊氏李斯特氏菌产生大的透明溶血环。

5.4.5 协同溶血试验 (cAMP)：在羊血琼脂平板上平行划线接种金黄色葡萄球菌和马红球菌， 挑取纯培养的单个可疑菌落垂直划线接种于平行线之间，垂直线两端不要触及平行线，于 30 ℃±1 ℃培养 24 h～48 h。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强，斯氏李斯特氏菌的溶血也增强，而伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌的接种端溶血增强。

5.5 可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统等对 5.3 中 3 个～5 个纯培养的可疑菌落进行鉴定。

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌生化特征与其他李斯特氏菌的区别

菌种	溶血反应	葡萄糖	麦芽糖	MR-VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特氏菌 (*L. monocytogenes*)	＋	＋	＋	＋/＋	－	＋	－	＋
格氏李斯特氏菌 (*L. grayi*)	－	＋	＋	＋/＋	＋	－	－	＋
斯氏李斯特氏菌 (*L. seeligeri*)	＋	＋	＋	＋/＋	－	－	＋	＋
威氏李斯特氏菌 (*L. welshimeri*)	－	＋	＋	＋/＋	－	V	＋	＋
伊氏李斯特氏菌 (*L. ivanovii*)	＋	＋	＋	＋/＋	－	－	＋	＋
英诺克李斯特氏菌 (*L. innocua*)	－	＋	＋	＋/＋	－	V	－	＋
注：＋阳性；－阴性；V 反应不定。								

5.6 小鼠毒力试验（可选择）

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中，于 30 ℃±1 ℃培养 24 h，4 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，用无菌生理盐水制备成浓度为 10^{10} CFU/mL 的菌悬液，取此菌悬液进行小鼠腹腔注射 3 只～5 只，每只 0.5 mL，观察小鼠死亡情况。致病株于 2 d～5 d 内死亡。试验时可用已知菌作对照。单核细胞增生李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌对小鼠有致病性。

6 结果与报告

综合以上生化试验和溶血试验结果，报告 25 g（mL）样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)

A.1.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2～7.4	

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调节 pH，分装，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.2 含 0.6%酵母膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)

A.2.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2～7.4	

A.2.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调节 pH，分装，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.3 李氏增菌肉汤(LB_1，LB_2)

A.3.1 成分

胰胨	5.0 g
多价胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钠	12.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2～7.4	

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.3.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.3.2.1 李氏Ⅰ液 (LB_1)225 mL 中加入：

1 % 萘啶酮酸 (用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制)	0.5 mL
1 % 吖啶黄 (用无菌蒸馏水配制)	0.3 mL

A.3.2.2 李氏Ⅱ液 (LB_2)200 mL 中加入：

1 % 萘啶酮酸	0.4 mL
1 % 吖啶黄	0.5 mL

A.4 PALCAM

A.4.1 成分

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g
七叶甙	0.8 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
甘露醇	10.0 g
酚红	0.1 g
氯化锂	15.0 g
酪蛋白胰酶消化物	10.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
肉胃酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2～7.4	

A.4.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.4.2.1 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	5.0 mg
盐酸吖啶黄	2.5 mg
头孢他啶	10.0 mg
无菌蒸馏水	500 mL

A.4.2.2 制法

将 PALCAM 基础培养基溶化后冷却到 50 ℃，加入 2 mL PALCAM 选择性添加剂，混匀后倾倒在无菌的平皿中，备用。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A.5.1.2 制法

食品伙伴网http://www.foodmate.net

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95％乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 将纯培养的单个可疑菌落涂片，火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.5.4.3 滴加 95％乙醇脱色，约 15 s～30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A.5.4.4 滴加复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

A.6 SIM 动力培养基

A.6.1 成分

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g
硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2	

A.6.2 制法

将上述各成分加热混匀，调节 pH，分装小试管，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.6.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种到 SIM 培养基中，于 30 ℃培养 24 h～48 h，观察结果。

A.7 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用)

A.7.1 成分

多胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.0	

A.7.2 制法

溶化后调节 pH，分装试管，每管 1 mL，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.7.3 甲基红（MR）试验

A.7.3.1 甲基红试剂

A.7.3.1.1 成分

甲基红	10 mg
95 %乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.7.3.1.2 制法

10 mg 甲基红溶于 30 mL 95 %乙醇中，然后加入 20 mL 蒸馏水。

A.7.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基，36 ℃±1 ℃培养 2 d～5 d。滴加甲基红试剂一滴，立即观察结果。鲜红色为阳性，黄色为阴性。

A.7.4 V-P 试验

A.7.4.1 6 % α-萘酚-乙醇溶液

成分及制法：取 α-萘酚 6.0 g，加无水乙醇溶解，定容至 100 mL。

A.7.4.2 40 %氢氧化钾溶液

成分及制法：取氢氧化钾 40 g，加蒸馏水溶解，定容至 100 mL。

A.7.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基，36 ℃±1 ℃培养 2 d～4 d。加入 6% α-萘酚-乙醇溶液 0.5 mL 和 40 %氢氧化钾溶液 0.2 mL，充分振摇试管，观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色，如为阴性，应放在 36 ℃±1 ℃继续培养 4 h 再进行观察。

A.8 血琼脂

A.8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g
蒸馏水	100 mL
脱纤维羊血	5 mL～10 mL

A.8.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外，加热溶化上述各组分，121 ℃高压灭菌 15 min，冷到 50 ℃，以无菌操作加入新鲜脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。

A.9 糖发酵管

A.9.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	2.0 g
0.2 %溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

A.9.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后，按 0.5 %加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内，

食品伙伴网http://www.foodmate.net

调节 pH 至 7.4，115 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.9.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶 100 mL，115 ℃高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10%溶液，同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内，以无菌操作分装小试管。

A.9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管，36 ℃±1 ℃培养 24 h～48 h，观察结果，蓝色为阴性，黄色为阳性。

A.10 过氧化氢酶试验

A.10.1 试剂

3%过氧化氢溶液：临用时配制。

A.10.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落, 置于洁净试管内，,滴加 3 %过氧化氢溶液 2 mL，观察结果。

A.10.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性，不发生气泡者为阴性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.35—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Lactic acid bacteria

2010-03-26 发布 2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 4789.35-2008《食品卫生微生物学检验　食品中乳酸菌检验》。

本标准与GB/T 4789.35-2008相比，主要变化如下：

——修改了乳酸菌总数、乳杆菌、双歧杆菌和嗜热链球菌的计数方法。

本标准的附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

—— GB 4789.35-1996、GB/T 4789.35-2003、GB/T 4789.35-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品微生物学检验　乳酸菌检验

1　范围

本标准规定了含乳酸菌食品中乳酸菌（lactic acid bacteria）的检验方法。

本标准适用于含活性乳酸菌的食品中乳酸菌的检验。

2　规范性引用文件

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

3　术语和定义

3.1　乳酸菌 lactic acid bacteria

一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称。本标准中乳酸菌主要为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和链球菌属（*Streptococcus*）。

4　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

4.1　恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

4.2　冰箱：2 ℃～5 ℃。

4.3　均质器及无菌均质袋、均质杯或灭菌乳钵。

4.4　天平：感量 0.1 g。

4.5　无菌试管：18 mm×180 mm、15 mm×100 mm。

4.6　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

4.7　无菌锥形瓶：500 mL、250 mL。

5　培养基和试剂

5.1　MRS（Man Rogosa Sharpe）培养基及莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）改良 MRS 培养基：见附录 A 中 A.1。

5.2　MC 培养基（Modified Chalmers 培养基）：见附录 A 中 A.2。

5.3　0.5 %蔗糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.4　0.5 %纤维二糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.5　0.5 %麦芽糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.6　0.5 %甘露醇发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.7　0.5 %水杨苷发酵管：见附录A中A.3。

5.8　0.5 %山梨醇发酵管：见附录A中A.3。

5.9　0.5 %乳糖发酵管：见附录A中A.3。

5.10 七叶苷发酵管：见附录A中A.4。

5.11 革兰氏染色液：见附录A中A.5。

5.12 莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）：化学纯。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6 检验程序

乳酸菌检验程序见图1。

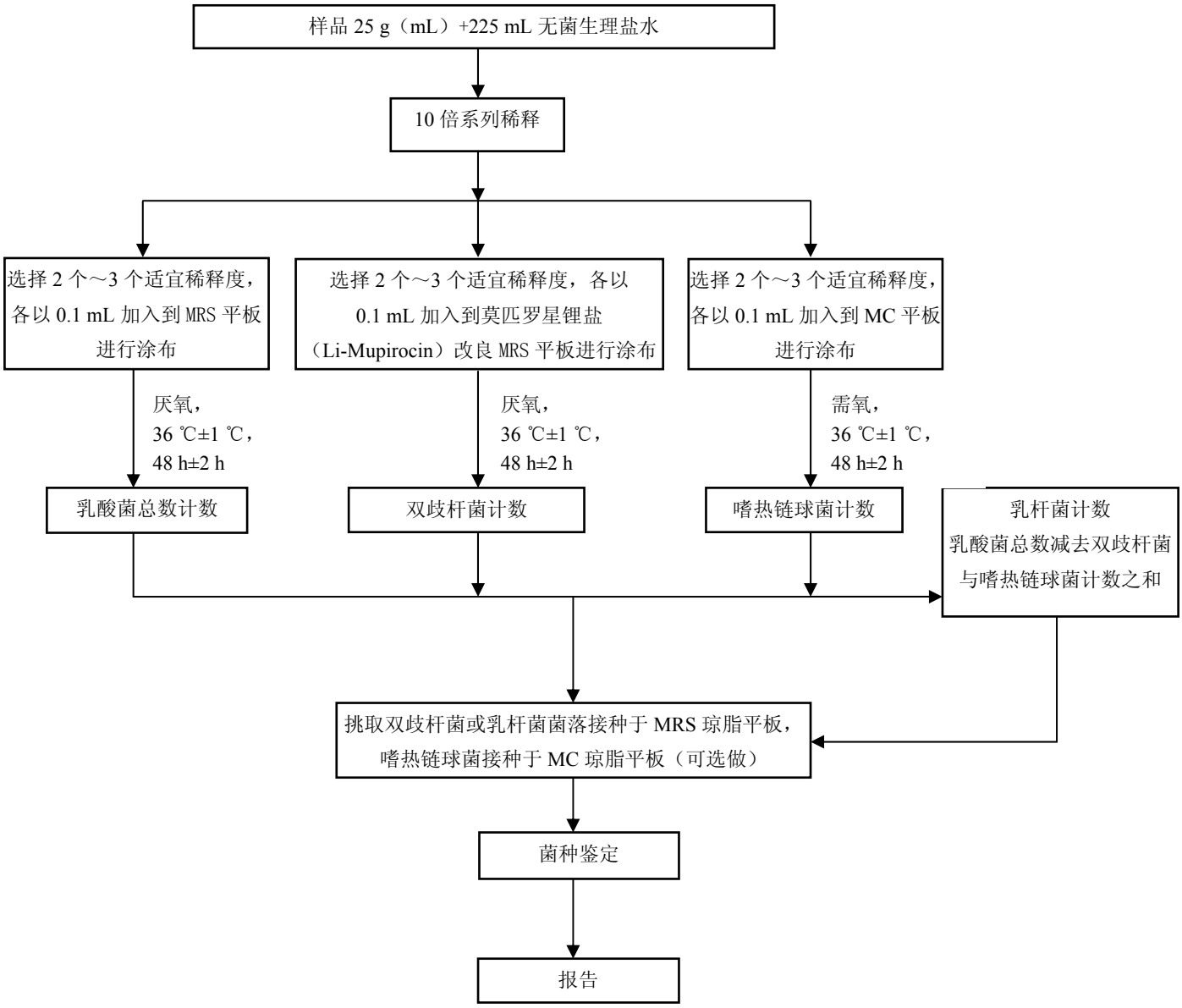


图1 乳酸菌检验程序图

7 操作步骤

7.1 样品制备

7.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

7.1.2 冷冻样品可先使其在 2 ℃～5 ℃条件下解冻，时间不超过 18 h，也可在温度不超过 45 ℃的条件解冻，时间不超过 15 min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

7.1.3 固体和半固体食品：以无菌操作称取 25 g 样品，置于装有 225 mL 生理盐水的无菌均质杯内，于 8000 r/min～10000 r/min 均质 1 min～2 min，制成 1:10 样品匀液；或置于 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min～2 min 制成 1:10 的样品匀液。

7.1.4 液体样品：液体样品应先将其充分摇匀后以无菌吸管吸取样品 25 mL 放入装有 225 mL 生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分振摇，制成 1:10 的样品匀液。

7.2 步骤

7.2.1 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中（注意吸管尖端不要触及稀释液），振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

7.2.2 另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头，按上述操作顺序，做 10 倍递增样品匀液，每递增稀释一次，即换用 1 次 1 mL 灭菌吸管或吸头。

7.2.3 乳酸菌计数

7.2.3.1 乳酸菌总数

根据待检样品活菌总数的估计，选择 2 个～3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MRS 琼脂平板，使用 L 形棒进行表面涂布。36℃±1℃，厌氧培养 48 h±2 h 后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15min 内完成。

7.2.3.2 双歧杆菌计数

根据对待检样品双歧杆菌含量的估计，选择 2 个～3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液于莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）改良 MRS 琼脂平板，使用灭菌 L 形棒进行表面涂布，每个稀释度作两个平板。36℃±1℃，厌氧培养 48 h±2 h 后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.3 嗜热链球菌计数

根据待检样品嗜热链球菌活菌数的估计，选择 2 个～3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MC 琼脂平板，使用 L 形棒进行表面涂布。36℃±1℃，需氧培养 48 h±2 h 后计数。嗜热链球菌在 MC 琼脂平板上的菌落特征为：菌落中等偏小，边缘整齐光滑的红色菌落，直径 2 mm±1 mm，菌落背面为粉红色。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.4 乳杆菌计数

7.2.3.1 项乳酸菌总数结果减去7.2.3.2 项双歧杆菌与7.2.3.3 项嗜热链球菌计数结果之和即得乳杆菌计数。

7.3 菌落计数

可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units，CFU）表示。

7.3.1 选取菌落数在 30 CFU～300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

7.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。

7.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

7.4 结果的表述

7.4.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g（mL）中菌落总数结果。

7.4.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按公式（1）计算：

$$N = \sum C \Big/ (n_1 + 0.1n_2)d \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

N——样品中菌落数；

$\sum C$——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

n_1——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n_2——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

7.4.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

7.4.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.4.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.4.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU～300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时，则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.5 菌落数的报告

7.5.1 菌落数小于 100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

7.5.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

7.5.3 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

8 结果与报告

根据菌落计数结果出具报告，报告单位以CFU/g（mL）表示。

9 乳酸菌的鉴定（可选做）

9.1 纯培养

挑取 3 个或以上单个菌落，嗜热链球菌接种于 MC 琼脂平板，乳杆菌属接种于 MRS 琼脂平板，置 36 ℃±1 ℃厌氧培养 48 h。

9.2 鉴定

9.2.1 双歧杆菌的鉴定按 GB/T 4789.34 的规定操作。

9.2.2 涂片镜检：乳杆菌属菌体形态多样，呈长杆状、弯曲杆状或短杆状。无芽胞，革兰氏染色阳性。嗜热链球菌菌体呈球形或球杆状，直径为 0.5 μm～2.0 μm，成对或成链排列，无芽胞，革兰氏染色阳性。

9.2.3 乳酸菌菌种主要生化反应见表 1 和表 2。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表1　常见乳杆菌属内种的碳水化合物反应

菌种	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	蔗糖	棉子糖
干酪乳杆菌干酪亚种（*L.casei subsp. casei*）	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
德氏乳杆菌保加利亚种（*L.delbrueckii subsp. bulgaricus*）	－	－	－	－	－	－	－	－
嗜酸乳杆菌（*L.acidophilus*）	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	d
罗伊氏乳杆菌（*L.reuteri*）	ND	－	＋	－	－	－	＋	＋
鼠李糖乳杆菌（*L.rhamnosus*）	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
植物乳杆菌（*L.plantarum*）	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
注:+表示90％以上菌株阳性；－表示90％以上菌株阴性；d表示11%～89%菌株阳性；ND表示未测定。								

表2　嗜热链球菌的主要生化反应

菌种	菊糖	乳糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	马尿酸	七叶苷
嗜热链球菌（*S.thermophilus*）	－	＋	－	－	－	－	－
注:+表示90％以上菌株阳性；－表示90％以上菌株阴性。							

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基及试剂

A.1 MRS 培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
酵母粉	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
$K_2HPO_4·7H_2O$	2.0 g
醋酸钠·$3H_2O$	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
$MgSO_4·7H_2O$	0.2 g
$MnSO_4·4H_2O$	0.05 g
琼脂粉	15.0 g
pH 6.2	

A.1.2 制法

将上述成分加入到 1000 mL 蒸馏水中，加热溶解，调节 pH，分装后 121 ℃高压灭菌 15 min～20 min。

A.1.3 莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）改良 MRS 培养基

A.1.3.1 莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）储备液制备：称取 50mg 莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）加入到 50 mL 蒸馏水中，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

A.1.3.2 制法

将 A.1.1 成分加入到 950 mL 蒸馏水中，加热溶解，调节 pH，分装后于 121 ℃高压灭菌 15 min～20 min。临用时加热熔化琼脂，在水浴中冷至 48 ℃，用带有 0.22 μm 微孔滤膜的注射器将莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）储备液加入到熔化琼脂中，使培养基中莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）的浓度为 50 μg/mL。

A.2 MC 培养基

A.2.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	20.0 g
乳糖	20.0 g
碳酸钙	10.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
1%中性红溶液	5.0 mL
pH6.0	

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.2.2 制法

将前面 7 种成分加入蒸馏水中，加热溶解，调节 pH，加入中性红溶液。分装后 121 ℃高压灭菌 15 min～20 min。

A.3 乳酸杆菌糖发酵管

A.3.1 基础成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
吐温 80	0.5 mL
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

按 0.5%加入所需糖类，并分装小试管，121 ℃高压灭菌 15 min～20 min。

A.4 七叶苷发酵管

A.4.1 成分

蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
七叶苷	3.0 g
柠檬酸铁	0.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

将上述成分加入蒸馏水中，加热溶解，121 ℃高压灭菌 15 min～20 min。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95％乙醇	20 mL
1％草酸铵水溶液	80 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.5.4.3 滴加 95 %乙醇脱色，约 15 s～30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A.5.4.4 滴加复染液，复染1 min。水洗、待干、镜检。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination：*Enterobacter sakazakii*

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 4789.40-2008 《食品卫生微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.40-2008 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中英文名称；

——删除了附录 A 中 A.3。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 4789.40-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
食品微生物学检验　阪崎肠杆菌检验

1　范围

本标准规定了食品中阪崎肠杆菌（*Enterobacter sakazakii*）的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中阪崎肠杆菌的检验。

2　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1　恒温培养箱：25 ℃±1 ℃，36 ℃±1 ℃，44 ℃±0.5 ℃。

2.2　冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.3　恒温水浴箱：44 ℃±0.5 ℃。

2.4　天平：感量 0.1 g。

2.5　均质器。

2.6　振荡器。

2.7　无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

2.8　无菌锥形瓶：容量 100 mL、200 mL、2000 mL。

2.9　无菌培养皿：直径 90 mm。

2.10　pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

2.11　全自动微生物生化鉴定系统。

3　培养基和试剂

3.1　缓冲蛋白胨水（buffer peptone water，BPW）：见附录 A 中 A.1。

3.2　改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）：见附录 A 中 A.2。

3.3　阪崎肠杆菌显色培养基。

3.4　胰蛋白胨大豆琼脂（trypticase soy agar，TSA）：见附录 A 中 A.3。

3.5　生化鉴定试剂盒。

3.6　氧化酶试剂：见附录 A 中 A.4。

3.7　L-赖氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.5。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.6。

3.9 L-精氨酸双水解酶培养基：见附录 A 中 A.7。

3.10 糖类发酵培养基：见附录 A 中 A.8。

3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.9。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第一法 阪崎肠杆菌的检验

4 检验程序

阪崎肠杆菌检验程序见图 1。

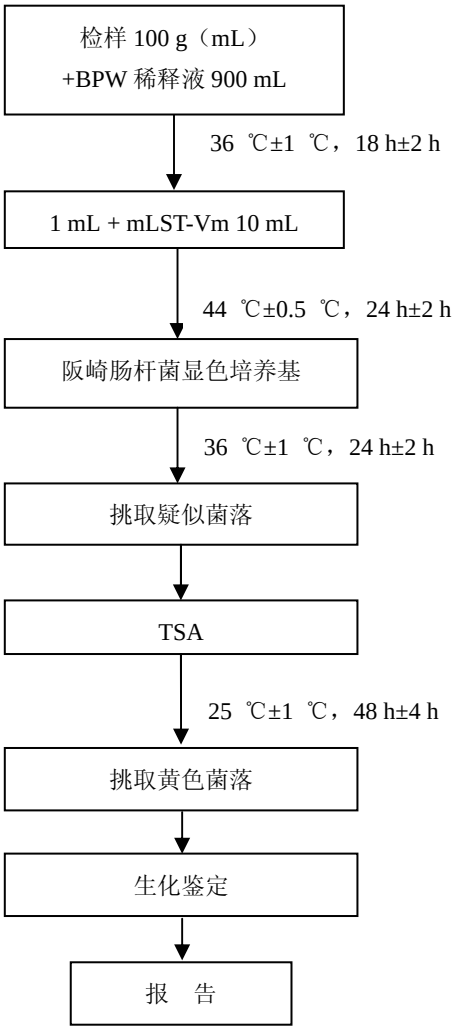


图 1 阪崎肠杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g（mL）加入已预热至 44 ℃装有 900 mL 缓冲蛋白胨水的锥形瓶中，用手缓缓地摇动至充分溶解，36 ℃±1 ℃培养 18 h±2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物，各取增菌培养物 1 环，分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色

食品伙伴网http://www.foodmate.net

培养基平板，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.2.2 挑取 1 个～5 个可疑菌落，划线接种于 TSA 平板。25 ℃±1 ℃培养 48 h±4 h。

5.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落，进行生化鉴定。阪崎肠杆菌的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表 1 阪崎肠杆菌的主要生化特征

生化试验		特　征
黄色素产生		＋
氧化酶		－
L-赖氨酸脱羧酶		－
L-鸟氨酸脱羧酶		（＋）
L-精氨酸双水解酶		＋
柠檬酸水解		（＋）
发酵	D-山梨醇	（－）
	L-鼠李糖	＋
	D-蔗糖	＋
	D-蜜二糖	＋
	苦杏仁甙	＋
注：＋＞99%阳性；－＞99%阴性；（＋）90%－99%阳性；（－）90%－99%阴性。		

6 结果与报告

综合菌落形态和生化特征，报告每 100 g（mL）样品中检出或未检出阪崎肠杆菌。

第二法 阪崎肠杆菌的计数

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 **固体和半固体样品：**无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各三份，加入已预热至 44 ℃分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分溶解，制成 1:10 样品匀液，置 36 ℃±1 ℃培养 18 h±2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。

7.1.2 **液体样品：**以无菌吸管分别取样品 100 mL、10 mL、1 mL 各三份，加入已预热至 44 ℃分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分混匀，制成 1:10 样品匀液，置 36 ℃±1 ℃培养 18h±2h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。

7.2 分离、鉴定

同 5.2，5.3。

8 结果与报告

食品伙伴网http://www.foodmate.net

综合菌落形态、生化特征，根据证实为阪崎肠杆菌的阳性管数，查 MPN 检索表，报告每 100 g（mL）样品中阪崎肠杆菌的 MPN 值（见附录 B 中表 B.1）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水（BPW）

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2	

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨（mLST）肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH。分装每管 10 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水，过滤除菌。万古霉素溶液可以在 0 ℃～5 ℃保存 15 天。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL，混合液中万古霉素的终浓度为 10 μg/ mL。

注：mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）

A.3.1 成分

食品伙伴网http://www.foodmate.net

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.3±0.2

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解，煮沸 1 min，调节 pH，121 ℃高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

N,*N*,*N*′,*N*′-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制，于冰箱内避光保存，在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 之内未变为紫红色、紫色或深蓝色，则为氧化酶试验阴性，否则即为氧化酶实验阳性。

注：实验中切勿使用镍/铬材料。

A.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐（L-lysine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL，121 ℃高压 15 min。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐（L-ornithine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.6.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.6.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐（L-arginine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.7.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.7.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白（酶消化）	10.0 g
氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.8.2 糖类溶液（D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙）

A.8.2.1 成分

糖	8.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g，溶于 100 mL 蒸馏水中，过滤除菌，制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作，将每种糖类溶液加入基础培养基，混匀；分装到无菌试管中，每管 10 mL。

A.8.4 实验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。糖类发酵试验阳性者，培养基呈黄色，阴性者为红色。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g～18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.9.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 10 mL，121 ℃高压 15 min，制成斜面。

A.9.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（规范性附录）
阪崎肠杆菌最可能数（MPN）检索表

B.1 阪崎肠杆菌最可能数（MPN）检索表

每 100 g（mL）检样中阪崎肠杆菌最可能数（MPN）的检索见表 B.1。

表 B.1 阪崎肠杆菌最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	＜0.3	--	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	＞110	42	--

注 1：本表采用 3 个检样量[100 g(mL)、10 g(mL)和 1 g(mL)]，每个检样量接种 3 管。

注 2：表内所列检样量如改用 1 000 g(mL)、10 g(mL)、和 1 g(mL)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 10 g(mL)、1 g(mL)、和 0.1 g(mL) 时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.12—2010

食品安全国家标准

食品中铅的测定

National food safety standard

Determination of lead in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5009.12-2003 《食品中铅的测定》。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5009.12-1985、GB/T 5009.12-1996、GB/T 5009.12-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中铅的测定

1 范围

本标准规定了食品中铅的测定方法。

本标准适用于食品中铅的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 石墨炉原子吸收光谱法

3 原理

试样经灰化或酸消解后，注入原子吸收分光光度计石墨炉中，电热原子化后吸收 283.3 nm 共振线，在一定浓度范围，其吸收值与铅含量成正比，与标准系列比较定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所使用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 硝酸：优级纯。

4.2 过硫酸铵。

4.3 过氧化氢（30%）。

4.4 高氯酸：优级纯。

4.5 硝酸（1＋1）：取 50 mL 硝酸慢慢加入 50 mL 水中。

4.6 硝酸（0.5 mol/L）：取 3.2 mL 硝酸加入 50 mL 水中，稀释至 100 mL。

4.7 硝酸（l mo1/L）：取 6.4 mL 硝酸加入 50 mL 水中，稀释至 100 mL。

4.8 磷酸二氢铵溶液（20 g/L）：称取 2.0 g 磷酸二氢铵，以水溶解稀释至 100 mL。

4.9 混合酸：硝酸十高氯酸（9＋1）。取 9 份硝酸与 1 份高氯酸混合。

4.10 铅标准储备液：准确称取 1.000 g 金属铅（99.99%），分次加少量硝酸（4.5），加热溶解，总量不超过 37 mL，移入 1000 mL 容量瓶，加水至刻度。混匀。此溶液每毫升含 1.0 mg 铅。

4.11 铅标准使用液：每次吸取铅标准储备液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，加硝酸（4.6）至刻度。如此

食品伙伴网http://www.foodmate.net

经多次稀释成每毫升含 10.0 ng，20.0 ng，40.0 ng，60.0 ng，80.0 ng 铅的标准使用液。

5 仪器和设备

5.1 原子吸收光谱仪，附石墨炉及铅空心阴极灯。

5.2 马弗炉。

5.3 天平：感量为 1 mg。

5.4 干燥恒温箱。

5.5 瓷坩埚。

5.6 压力消解器、压力消解罐或压力溶弹。

5.7 可调式电热板、可调式电炉。

6 分析步骤

6.1 试样预处理

6.1.1 在采样和制备过程中，应注意不使试样污染。

6.1.2 粮食、豆类去杂物后，磨碎，过 20 目筛，储于塑料瓶中，保存备用。

6.1.3 蔬菜、水果、鱼类、肉类及蛋类等水分含量高的鲜样，用食品加工机或匀浆机打成匀浆，储于塑料瓶中，保存备用。

6.2 试样消解（可根据实验室条件选用以下任何一种方法消解）

6.2.1 压力消解罐消解法：称取 1 g～2 g 试样（精确到 0.001 g，干样、含脂肪高的试样＜1 g，鲜样＜2 g 或按压力消解罐使用说明书称取试样）于聚四氟乙烯内罐，加硝酸（4.1）2 mL～4 mL 浸泡过夜。再加过氧化氢（4.3）2 mL～3 mL（总量不能超过罐容积的 1/3）。盖好内盖，旋紧不锈钢外套，放入恒温干燥箱，120 ℃～140 ℃保持 3 h～4 h，在箱内自然冷却至室温，用滴管将消化液洗入或过滤入（视消化后试样的盐分而定）10 mL～25 mL 容量瓶中，用水少量多次洗涤罐，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

6.2.2 干法灰化：称取 1 g～5 g 试样（精确到 0.001 g，根据铅含量而定）于瓷坩埚中，先小火在可调式电热板上炭化至无烟，移入马弗炉 500℃±25℃灰化 6 h～8 h，冷却。若个别试样灰化不彻底，则加 1 mL 混合酸（4.9）在可调式电炉上小火加热，反复多次直到消化完全，放冷，用硝酸（4.6）将灰分溶解，用滴管将试样消化液洗入或过滤入（视消化后试样的盐分而定）10 mL～25 mL 容量瓶中，用水少量多次洗涤瓷坩埚，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

6.2.3 过硫酸铵灰化法：称取 1 g～5 g 试样（精确到 0.001 g）于瓷坩埚中，加 2 mL～4 mL 硝酸（4.1）浸泡 1 h 以上，先小火炭化，冷却后加 2.00 g～3.00 g 过硫酸铵（4.2）盖于上面，继续炭化至不冒烟，转入马弗炉，500 ℃±25 ℃恒温 2 h, 再升至 800 ℃，保持 20 min，冷却，加 2 mL～3 mL 硝酸（4.7），用滴管将试样消化液洗入或过滤入（视消化后试样的盐分而定）10 mL～25 mL 容量瓶中，用水少量多次洗涤瓷坩埚，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

6.2.4 湿式消解法：称取试样 1 g～5 g（精确到 0.001 g）于锥形瓶或高脚烧杯中，放数粒玻璃珠，加 10 mL 混合酸（4.9），加盖浸泡过夜，加一小漏斗于电炉上消解，若变棕黑色，再加混合酸，直至冒白烟，消化液呈无色透明或略带黄色，放冷，用滴管将试样消化液洗入或过滤入（视消化后试样的盐分而定）10 mL～25 mL 容量瓶中，用水少量多次洗涤锥形瓶或高脚烧杯，洗液合并于容量瓶中并定容至

食品伙伴网http://www.foodmate.net

刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

6.3 测定

6.3.1 仪器条件：根据各自仪器性能调至最佳状态。参考条件为波长 283.3 nm，狭缝 0.2 nm～1.0 nm，灯电流 5 mA～7 mA，干燥温度 120 ℃，20 s；灰化温度 450 ℃，持续 15 s～20 s，原子化温度：1700 ℃～2300 ℃，持续 4 s～5 s，背景校正为氘灯或塞曼效应。

6.3.2 标准曲线绘制：吸取上面配制的铅标准使用液 10.0 ng/mL（或 μg/L），20.0 ng/mL（或 μg/L），40.0 ng/mL（或 μg/L），60.0 ng/mL（或 μg/L），80.0 ng/mL（或 μg/L）各 10 μL，注入石墨炉，测得其吸光值并求得吸光值与浓度关系的一元线性回归方程。

6.3.3 试样测定：分别吸取样液和试剂空白液各 10 μL，注入石墨炉，测得其吸光值，代入标准系列的一元线性回归方程中求得样液中铅含量。

6.3.4 基体改进剂的使用：对有干扰试样，则注入适量的基体改进剂磷酸二氢铵溶液（4.8）（一般为 5 μL 或与试样同量）消除干扰。绘制铅标准曲线时也要加入与试样测定时等量的基体改进剂磷酸二氢铵溶液。

7 分析结果的表述

试样中铅含量按式（1）进行计算。

$$X=\frac{(c_1-c_0)\times V\times 1000}{m\times 1000\times 1000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中铅含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）；

c_1——测定样液中铅含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

c_0——空白液中铅含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V——试样消化液定量总体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量或体积，单位为克或毫升（g 或 mL）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20 %。

第二法 氢化物原子荧光光谱法

9 原理

试样经酸热消化后，在酸性介质中，试样中的铅与硼氢化钠($NaBH_4$)或硼氢化钾(KBH_4)反应生成挥发性铅的氢化物(PbH_4)。以氩气为载气，将氢化物导入电热石英原子化器中原子化，在特制铅空心阴极灯照射下，基态铅原子被激发至高能态；在去活化回到基态时，发射出特征波长的荧光，其荧光强度与铅含量成正比，根据标准系列进行定量。

10 试剂和材料

10.1 硝酸+高氯酸混合酸(9+1)：分别量取硝酸 900 mL，高氯酸 100 mL，混匀。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.2 盐酸(1+1)：量取 250 mL 盐酸倒入 250 mL 水中，混匀。

10.3 草酸溶液(10 g/L)：称取 1.0 g 草酸，加入溶解至 100 mL，混匀。

10.4 铁氰化钾[$K_3Fe(CN)_6$]溶液(100 g/L)：称取 10.0 g 铁氰化钾，加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。

10.5 氢氧化钠溶液(2 g/L)：称取 2.0 g 氢氧化钠，溶于 1 L 水中，混匀。

10.6 硼氢化钠($NaBH_4$)溶液(10 g/L)：称取 5.0 g 硼氢化钠溶于 500 mL 氢氧化钠溶液(2 g/L)中，混匀，临用前配制。

10.7 铅标准储备液(1.0 mg/mL)。

10.8 铅标准使用液(1.0 μg/mL)：精确吸取铅标准储备液(10.7)，逐级稀释至 1.0 μg/mL。

11 仪器和设备

11.1 原子荧光光度计。

11.2 铅空心阴极灯。

11.3 电热板。

11.4 天平：感量为 1 mg。

12 分析步骤

12.1 试样消化

湿消解：称取固体试样0.2 g～2 g或液体试样2.00 g（或mL）～10.00 g（或mL）（均精确到0.001 g），置于50 mL～100 mL消化容器中（锥形瓶），然后加入硝酸+高氯酸混合酸（10.1）5 mL～10 mL摇匀浸泡，放置过夜。次日置于电热板上加热消解，至消化液呈淡黄色或无色(如消解过程色泽较深，稍冷补加少量硝酸，继续消解)，稍冷加入20 mL水再继续加热赶酸，至消解液0.5 mL～1.0 mL止，冷却后用少量水转入25 mL容量瓶中，并加入盐酸（10.2）0.5mL，草酸溶液（10.3）0.5 mL，摇匀，再加入铁氰化钾溶液（10.4）1.00 mL，用水准确稀释定容至25 mL，摇匀，放置30 min 后测定。同时做试剂空白。

12.2 标准系列制备

在25 mL容量瓶中，依次准确加入铅标准使用液（10.8）0.00 mL、0.125 mL、0.25 mL、0.50 mL、0.75 mL、1.00 mL、1.25 mL(各相当于铅浓度 0.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、30.0 ng/mL、40.0 ng/mL、50.0 ng/mL)，用少量水稀释后，加入0.5 mL盐酸（10.2）和0.5 mL草酸溶液（10.3）摇匀，再加入铁氰化钾溶液（10.4）1.0 mL，用水稀释至该度，摇匀。放置30 min 后待测。

12.3测定

12.3.1 仪器参考条件

负高压：323 V；铅空心阴极灯灯电流：75 mA；原子化器：炉温 750 ℃～800 ℃，炉高 8 mm；氩气流速：载气 800 mL/min；屏蔽气：1000 mL/min；加还原剂时间：7.0 s；读数时间：15.0 s；延迟时间：0.0 s；测量方式：标准曲线法；读数方式：峰面积；进样体积：2.0 mL。

12.3.2 测量方式

设定好仪器的最佳条件，逐步将炉温升至所需温度，稳定10 min～20 min后开始测量：连续用标准系列的零管进样，待读数稳定之后，转入标准系列的测量，绘制标准曲线，转入试样测量，分别测定试

食品伙伴网http://www.foodmate.net

样空白和试样消化液，试样测定结果按式（2）计算。

13 分析结果的表述

试样中铅含量按式（2）进行计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_0) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \quad \cdots\cdots (2)$$

试中：

X——试样中铅含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）；

c_1——试样消化液测定浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

c_0——试剂空白液测定浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V——试样消化液定量总体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量或体积，单位为克或毫升（g 或 mL）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第三法　　火焰原子吸收光谱法

15 原理

试样经处理后，铅离子在一定 pH 条件下与二乙基二硫代氨基甲酸钠（DDTC）形成络合物，经 4-甲基-2-戊酮萃取分离，导入原子吸收光谱仪中，火焰原子化后，吸收 283.3 nm 共振线，其吸收量与铅含量成正比，与标准系列比较定量。

16 试剂和材料

16.1 混合酸：硝酸-高氯酸（9＋1）。

16.2 硫酸铵溶液（300 g/L）：称取 30 g 硫酸铵[（NH_4）$_2SO_4$]，用水溶解并稀释至 100 mL。

16.3 柠檬酸铵溶液（250 g/L）：称取 25 g 柠檬酸铵，用水溶解并稀释至 100 mL。

16.4 溴百里酚蓝水溶液（1 g/L）。

16.5 二乙基二硫代氨基甲酸钠（DDTC）溶液（50 g/L）：称取 5 g 二乙基二硫代氨基甲酸钠，用水溶解并加水至 100 mL。

16.6 氨水（1＋1）。

16.7 4-甲基-2-戊酮（MIBK）。

16.8 铅标准溶液：操作同 10.7 和 10.8。配制铅标准使用液为 10 μg/mL。

16.9 盐酸（1+11）：取 10 mL 盐酸加入 110 mL 水中，混匀。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

16.10 磷酸溶液（1+10）：取 10 mL 磷酸加入 100 mL 水中，混匀。

17 仪器和设备

17.1 原子吸收光谱仪火焰原子化器，其余同 5.2，5.3，5.4，5.5，5.6 和 5.7。

17.2 天平：感量为 1 mg。

18 分析步骤

18.1 试样处理

18.1.1 饮品及酒类：取均匀试样 10 g～20 g（精确到 0.01 g）于烧杯中（酒类应先在水浴上蒸去酒精），于电热板上先蒸发至一定体积后，加入混合酸（16.1）消化完全后，转移、定容于 50 mL 容量瓶中。

18.1.2 包装材料浸泡液可直接吸取测定。

18.1.3 谷类：去除其中杂物及尘土，必要时除去外壳，碾碎，过 30 目筛，混匀。称取 5 g～10 g 试样（精确到 0.01 g），置于 50 mL 瓷坩埚中，小火炭化，然后移入马弗炉中，500 ℃以下灰化 16 h 后，取出坩埚，放冷后再加少量混合酸（16.1），小火加热，不使干涸，必要时再加少许混合酸，如此反复处理，直至残渣中无炭粒，待坩埚稍冷，加 10 mL 盐酸（16.9），溶解残渣并移入 50 mL 容量瓶中，再用水反复洗涤坩埚，洗液并入容量瓶中，并稀释至刻度，混匀备用。

取与试样相同量的混合酸和盐酸（16.9），按同一操作方法作试剂空白试验。

18.1.4 蔬菜、瓜果及豆类：取可食部分洗净晾干，充分切碎混匀。称取 10 g～20 g（精确到 0.01 g）于瓷坩埚中，加 1 mL 磷酸溶液（16.10），小火炭化，以下按 18.1.3 自“然后移入马弗炉中……”起依法操作。

18.1.5 禽、蛋、水产及乳制品：取可食部分充分混匀。称取 5 g～10 g（精确到 0.01 g）于瓷坩埚中，小火炭化，以下按 18.1.3 自“然后移入马弗炉中……”起依法操作。

乳类经混匀后，量取 50.0 mL，置于瓷坩埚中，加磷酸（16.10），在水浴上蒸干，再加小火炭化，以下按 18.1.3 自“然后移入马弗炉中……”起依法操作。

18.2 萃取分离

视试样情况，吸取 25.0 mL～50.0 mL 上述制备的样液及试剂空白液，分别置于 125 mL 分液漏斗中，补加水至 60 mL。加 2 mL 柠檬酸铵溶液（16.3），溴百里酚蓝水溶液（16.4）3 滴～5 滴，用氨水（16.6）调 pH 至溶液由黄变蓝，加硫酸铵溶液（16.2）10.0 mL，DDTC 溶液（16.5）10 mL，摇匀。放置 5 min 左右，加入 10.0 mL（16.7） MIBK，剧烈振摇提取 1 min，静置分层后，弃去水层，将 MIBK 层放入 10 mL 带塞刻度管中，备用。分别吸取铅标准使用液 0.00 mL，0.25 mL，0.50 mL，1.00 mL，1.50 mL，2.00 mL（相当 0.0 μg，2.5 μg，5.0 μg，10.0 μg，15.0 μg，20.0 μg 铅）于 125 mL 分液漏斗中。与试样相同方法萃取。

18.3 测定

18.3.1 饮品、酒类及包装材料浸泡液可经萃取直接进样测定。

18.3.2 萃取液进样，可适当减小乙炔气的流量。

18.3.3 仪器参考条件：空心阴极灯电流 8 mA；共振线 283.3 nm；狭缝 0.4 nm；空气流量 8 L / min；燃烧器高度 6 mm。

19 分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

试样中铅含量按式（3）进行计算。

$$X = \frac{(c_1 - c_0) \times V_1 \times 1000}{m \times V_3 / V_2 \times 1000} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X——试样中铅的含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）；

c_1——测定用试样中铅的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_0——试剂空白液中铅的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样质量或体积，单位为克或毫升（g 或 mL）；

V_1——试样萃取液体积，单位为毫升（mL）；

V_2——试样处理液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_3——测定用试样处理液的总体积，单位为毫升（mL）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

20 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20 %。

第四法 二硫腙比色法

21 原理

试样经消化后，在 pH 8.5～9.0 时，铅离子与二硫腙生成红色络合物，溶于三氯甲烷。加入柠檬酸铵、氰化钾和盐酸羟胺等，防止铁、铜、锌等离子干扰，与标准系列比较定量。

22 试剂和材料

22.1 氨水（1+1）。

22.2 盐酸（1＋1）：量取 100 mL 盐酸，加入 100 mL 水中。

22.3 酚红指示液（1 g/L）：称取 0.10 g 酚红， 用少量多次乙醇溶解后移入 100 mL 容量瓶中并定容至刻度。

22.4 盐酸羟胺溶液（200 g/L）：称取 20.0 g 盐酸羟胺，加水溶解至 50 mL，加 2 滴酚红指示液，加氨水（1+1），调 pH 至 8.5～9.0（由黄变红，再多加 2 滴），用二硫腙-三氯甲烷溶液（22.10）提取至三氯甲烷层绿色不变为止，再用三氯甲烷洗二次，弃去三氯甲烷层，水层加盐酸（1＋1）至呈酸性，加水至 100 mL。

22.5 柠檬酸铵溶液（200 g/L）：称取 50 g 柠檬酸铵，溶于 100 mL 水中，加 2 滴酚红指示液（22.3），加氨水（22.1），调 pH 至 8.5～9.0，用二硫腙-三氯甲烷溶液（22.10）提取数次，每次 10 mL～20 mL，至三氯甲烷层绿色不变为止，弃去三氯甲烷层，再用三氯甲烷洗二次，每次 5 mL，弃去三氯甲烷层，加水稀释至 250 mL。

22.6 氰化钾溶液（100 g/L）：称取 10.0 g 氰化钾，用水溶解后稀释至 100 mL。

22.7 三氯甲烷：不应含氧化物。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

22.7.1 检查方法：量取 10 mL 三氯甲烷，加 25 mL 新煮沸过的水，振摇 3 min，静置分层后，取 10 mL 水溶液，加数滴碘化钾溶液（150 g/L）及淀粉指示液，振摇后应不显蓝色。

22.7.2 处理方法：于三氯甲烷中加入 1/10～1/20 体积的硫代硫酸钠溶液（200 g/L）洗涤，再用水洗后加入少量无水氯化钙脱水后进行蒸馏，弃去最初及最后的十分之一馏出液，收集中间馏出液备用。

22.8 淀粉指示液：称取 0.5 g 可溶性淀粉，加 5 mL 水搅匀后，慢慢倒入 100 mL 沸水中，边倒边搅拌，煮沸，放冷备用，临用时配制。

22.9 硝酸（1＋99）：量取 1 mL 硝酸，加入 99 mL 水中。

22.10 二硫腙-三氯甲烷溶液（0.5 g/L）：保存冰箱中，必要时用下述方法纯化。

称取 0.5 g 研细的二硫腙, 溶于 50 mL 三氯甲烷中，如不全溶，可用滤纸过滤于 250 mL 分液漏斗中，用氨水（1＋99）提取三次，每次 100 mL，将提取液用棉花过滤至 500 mL 分液漏斗中，用盐酸（1＋1）调至酸性，将沉淀出的二硫腙用三氯甲烷提取 2 次～3 次，每次 20 mL，合并三氯甲烷层，用等量水洗涤两次，弃去洗涤液，在 50 ℃水浴上蒸去三氯甲烷。精制的二硫腙置硫酸干燥器中，干燥备用。或将沉淀出的二硫腙用 200 mL，200 mL，100 mL 三氯甲烷提取三次，合并三氯甲烷层为二硫腙溶液。

22.11 二硫腙使用液：吸取 1.0 mL 二硫腙溶液，加三氯甲烷至 10 mL，混匀。用 1 cm 比色杯，以三氯甲烷调节零点，于波长 510 nm 处测吸光度（A），用式（4）算出配制 100 mL 二硫腙使用液（70%透光率）所需二硫腙溶液的毫升数（V）。

$$V = \frac{10 \times (2 - \lg 70)}{A} = \frac{1.55}{A} \quad \cdots\cdots (4)$$

22.12 硝酸-硫酸混合液（4＋1）。

22.13 铅标准溶液（1.0 mg/mL）：准确称取 0.1598 g 硝酸铅，加 10 mL 硝酸（1＋99），全部溶解后，移入 100 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。

22.14 铅标准使用液（10.0 μg/mL）：吸取 1.0 mL 铅标准溶液，置于 100 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。

23 仪器和设备

23.1 分光光度计。

23.2 天平：感量为 1 mg。

24 分析步骤

24.1 试样预处理

同 6.1 的操作。

24.2 试样消化

24.2.1 硝酸-硫酸法

24.2.1.1 粮食、粉丝、粉条、豆干制品、糕点、茶叶等及其他含水分少的固体食品：称取 5 g 或 10 g 的粉碎样品（精确到 0.01 g），置于 250 mL～500 mL 定氮瓶中，先加水少许使湿润，加数粒玻璃珠、10 mL～15 mL 硝酸，放置片刻，小火缓缓加热，待作用缓和，放冷。沿瓶壁加入 5 mL 或 10 mL 硫酸，再加热，至瓶中液体开始变成棕色时，不断沿瓶壁滴加硝酸至有机质分解完全。加大火力，至产生

食品伙伴网http://www.foodmate.net

白烟，待瓶口白烟冒净后，瓶内液体再产生白烟为消化完全，该溶液应澄清无色或微带黄色，放冷（在操作过程中应注意防止爆沸或爆炸）。加 20 mL 水煮沸，除去残余的硝酸至产生白烟为止，如此处理两次，放冷。将冷后的溶液移入 50 mL 或 100 mL 容量瓶中，用水洗涤定氮瓶，洗液并入容量瓶中，放冷，加水至刻度，混匀。定容后的溶液每 10 mL 相当于 1 g 样品，相当加入硫酸量 1 mL。取与消化试样相同量的硝酸和硫酸，按同一方法做试剂空白试验。

24.2.1.2 蔬菜、水果：称取 25.00 g 或 50.00 g 洗净打成匀浆的试样（精确到 0.01 g），置于 250 mL～500 mL 定氮瓶中，加数粒玻璃珠、10 mL～15 mL 硝酸，以下按 24.2.1.1 自“放置片刻……”起依法操作，但定容后的溶液每 10 mL 相当于 5 g 样品，相当加入硫酸 1 mL。

24.2.1.3 酱、酱油、醋、冷饮、豆腐、腐乳、酱腌菜等：称取 10 g 或 20 g 试样（精确到 0.01 g）或吸取 10.0 mL 或 20.0 mL 液体样品，置于 250 mL～500 mL 定氮瓶中，加数粒玻璃珠、5 mL～15 mL 硝酸。以下按 24.2.1.1 自“放置片刻……”起依法操作，但定容后的溶液每 10 mL 相当于 2 g 或 2 mL 试样。

24.2.1.4 含酒精性饮料或含二氧化碳饮料: 吸取 10.00 mL 或 20.00 mL 试样, 置于 250 mL～500 mL 定氮瓶中. 加数粒玻璃珠, 先用小火加热除去乙醇或二氧化碳, 再加 5 mL～10 mL 硝酸, 混匀后, 以下按 24.2.1.1 自“放置片刻……”起依法操作, 但定容后的溶液每 10 mL 相当于 2 mL 试样。

24.2.1.5 含糖量高的食品：称取 5 g 或 10 g 试样（精确至 0.01 g），置于 250 mL～500 mL 定氮瓶中，先加少许水使湿润，加数粒玻璃珠、5 mL～10 mL 硝酸，摇匀。缓缓加入 5 mL 或 10 mL 硫酸，待作用缓和停止起泡沫后，先用小火缓缓加热（糖分易炭化），不断沿瓶壁补加硝酸，待泡沫全部消失后，再加大火力，至有机质分解完全，发生白烟，溶液应澄清无色或微带黄色，放冷。以下按 24.2.1.1 自“加 20 mL 水煮沸……”起依法操作。

24.2.1.6 水产品：取可食部分样品捣成匀浆，称取 5 g 或 10 g 试样（精确至 0.01 g，海产藻类、贝类可适当减少取样量），置于 250 mL～500 mL 定氮瓶中，加数粒玻璃珠，5 mL～10 mL 硝酸，混匀后，以下按 24.2.1.1 自“沿瓶壁加入 5 mL 或 10 mL 硫酸……”起依法操作。

24.2.2 灰化法

24.2.2.1 粮食及其他含水分少的食品：称取 5 g 试样（精确至 0.01 g），置于石英或瓷坩埚中，加热至炭化，然后移入马弗炉中, 500 ℃灰化 3 h, 放冷，取出坩埚，加硝酸（1＋1），润湿灰分，用小火蒸干，在 500 ℃烧 1 h, 放冷。取出坩埚。加 1 mL 硝酸（1＋1），加热，使灰分溶解，移入 50 mL 容量瓶中，用水洗涤坩埚，洗液并入容量瓶中，加水至刻度，混匀备用。

24.2.2.2 含水分多的食品或液体试样：称取 5.0 g 或吸取 5.00 mL 试样，置于蒸发皿中，先在水浴上蒸干，再按 24.2.2.1 自“加热至炭化……”起依法操作。

24.3 测定

24.3.1 吸取 10.0 mL 消化后的定容溶液和同量的试剂空白液，分别置于 125 mL 分液漏斗中，各加水至 20 mL。

24.3.2 吸取 0 mL，0.10 mL，0.20 mL，0.30 mL，0.40 mL，0.50 mL 铅标准使用液（相当 0.0 μg，1.0 μg，2.0 μg，3.0 μg，4.0 μg，5.0 μg 铅），分别置于 125 mL 分液漏斗中，各加硝酸（1+99）至 20 mL。于试样消化液、试剂空白液和铅标准液中各加 2.0 mL 柠檬酸铵溶液（200 g/L），1.0 mL 盐酸羟胺溶液（200 g/L）和 2 滴酚红指示液，用氨水（1＋1）调至红色，再各加 2.0 mL 氰化钾溶液（100 g/L），混匀。各加 5.0 mL 二硫腙使用液，剧烈振摇 1 min，静置分层后，三氯甲烷层经脱脂棉滤入 1 cm 比色杯中，以三氯甲烷调节零点于波长 510 nm 处测吸光度，各点减去零管吸收值后，绘制标准曲线或计算一元回归方程，试样与曲线比较。

25 分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

试样中铅含量按式（5）进行计算。

$$X=\frac{(m_1-m_2)\times 1000}{m_3\times V_2/V_1\times 1000} \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

X ——试样中铅的含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）；

m_1 ——测定用试样液中铅的质量，单位为微克（μg）；

m_2 ——试剂空白液中铅的质量，单位为微克（μg）；

m_3 ——试样质量或体积，单位为克或毫升（g 或 mL）；

V_1 ——试样处理液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——测定用试样处理液的总体积，单位为毫升（mL）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

26 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第五法 单扫描极谱法

27 原理

试样经消解后，铅以离子形式存在。在酸性介质中，Pb^{2+}与 I^-形成的 PbI_4^{2-}络离子具有电活性，在滴汞电极上产生还原电流。峰电流与铅含量呈线性关系，以标准系列比较定量。

28 试剂和材料

28.1 底液：称取 5.0 g 碘化钾，8.0 g 酒石酸钾钠，0.5 g 抗坏血酸于 500 mL 烧杯中，加入 300 mL 水溶解后，再加入 10 mL 盐酸，移入 500 mL 容量瓶中，加水至刻度。（在冰箱中可保存 2 个月）

28.2 铅标准贮备溶液（1.0 mg/mL）：准确称取 0.1000 g 金属铅（含量 99.99 %）于烧杯中加 2 mL（1+1）硝酸溶液，加热溶解，冷却后定量移入 100 mL 容量瓶并加水至刻度，混匀。

28.3 铅标准使用溶液（10.0 μg/mL）：临用时，吸取铅标准贮备溶液 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。

28.4 混合酸：硝酸-高氯酸（4+1），量取 80 mL 硝酸，加入 20 mL 高氯酸，混匀。

29 仪器和设备

29.1 极谱分析仪。

29.2 带电子调节器万用电炉。

29.3 天平：感量为 1 mg。

30 分析步骤

30.1 极谱分析参考条件

食品伙伴网http://www.foodmate.net

单扫描极谱法(SSP 法)。选择起始电位为-350 mV，终止电位-850 mV，扫描速度 300 m V/s，三电极，二次导数，静止时间 5 s 及适当量程。于峰电位（Ep）-470 mV 处，记录铅的峰电流。

30.2 标准曲线绘制

准确吸取铅标准使用溶液 0 mL，0.05 mL，0.10 mL，0.20 mL，0.30 mL，0.40 mL(相当于含 0 μg，0.5 μg，1.0 μg，2.0 μg，3.0 μg，4.0 μg 铅)于 10 mL 比色管中，加底液至 10.0 mL，混匀。将各管溶液依次移入电解池，置于三电极系统。按上述极谱分析参考条件测定，分别记录铅的峰电流。以含量为横坐标，其对应的峰电流为纵坐标，绘制标准曲线。

30.3 试样处理

粮食、豆类等水分含量低的试样，去杂物后磨碎过 20 目筛；蔬菜、水果、鱼类、肉类等水分含量高的新鲜试样，用均浆机均浆，储于塑料瓶。

30.3.1 试样处理（除食盐、白糖外，如粮食、豆类、糕点、茶叶、肉类等）：称取 1 g～2 g 试样（精确至 0.1 g）于 50 mL 三角瓶中,加入 10 mL～20 mL 混合酸，加盖浸泡过夜。置带电子调节器万用电炉上的低档位加热。若消解液颜色逐渐加深，呈现棕黑色时，移开万用电炉，冷却，补加适量硝酸，继续加热消解。待溶液颜色不再加深，呈无色透明或略带黄色，并冒白烟，可高档位驱赶剩余酸液，至近干，在低档位加热得白色残渣，待测。同时作一试剂空白。

30.3.2 食盐、白糖：称取试样 2.0 g 于烧杯中，待测。

30.3.3 液体试样

称取 2 g 试样（精确至 0.1 g）于 50 mL 三角瓶中（含乙醇、二氧化碳的试样应置于 80℃水浴上驱赶）。加入 1 mL～10 mL 混合酸，于带电子调节器万用电炉上的低档位加热，以下步骤按 30.3.1“试样处理”项下操作，待测。

30.4 试样测定

于上述待测试样及试剂空白瓶中加入 10.0 mL 底液,溶解残渣并移入电解池。以下按 30.2“标准曲线绘制”项下操作，极谱图参见附录 A。分别记录试样及试剂空白的峰电流，用标准曲线法计算试样中铅含量。

31 分析结果的表述

试样中铅含量按式（6）进行计算。

$$X = \frac{(A - A_0) \times 1000}{m \times 1000} \qquad \cdots\cdots (6)$$

式中：

X——试样中铅的含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）；

A——由标准曲线上查得测定样液中铅的质量，单位为微克（μg）；

A_0——由标准曲线上查得试剂空白液中铅质量，单位为微克（μg）；

m——试样质量或体积，单位为克或毫升（g 或 mL）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

32 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5.0 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

33 其他

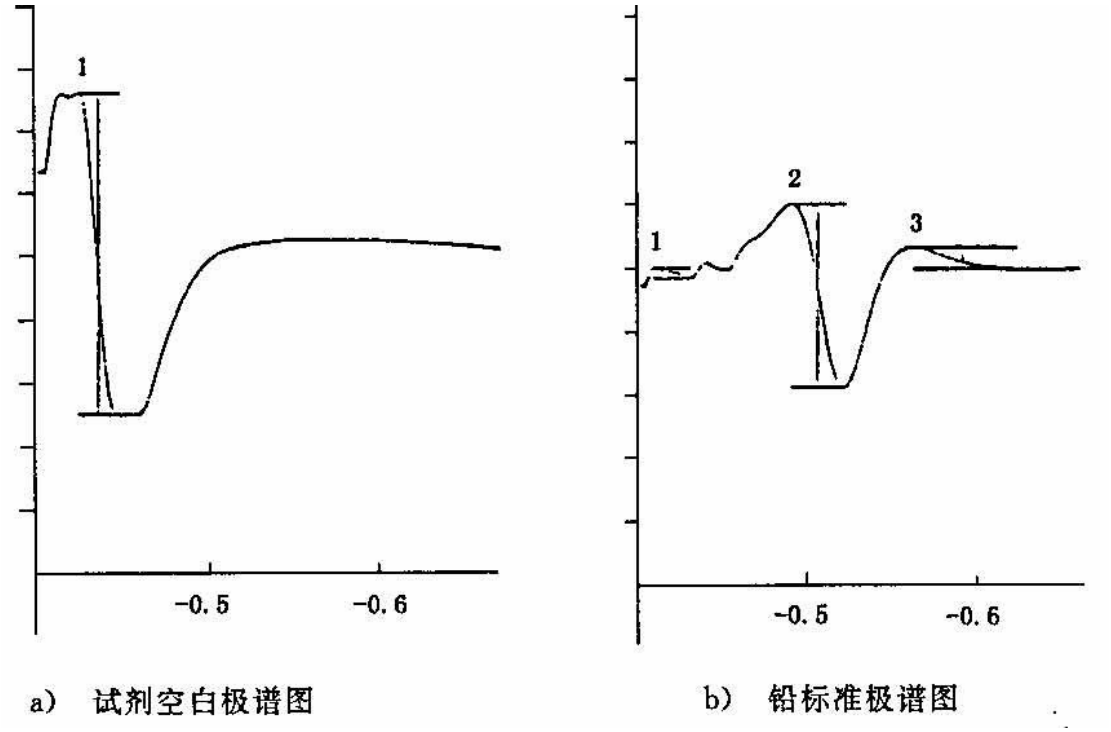
本标准检出限：石墨炉原子吸收光谱法为 0.005 mg/kg；氢化物原子荧光光谱法固体试样为 0.005 mg/kg，液体试样为 0.001 mg/kg；火焰原子吸收光谱法为 0.1 mg/kg；比色法为 0.25 mg/kg。单扫描极谱法为 0.085 mg/kg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
试剂空白、铅标准极谱图

A.1 试剂空白、铅标准极谱图

试剂空白、铅标准极谱图见图 A.1。



图A.1 试剂空白、铅标准极谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.24—2010

食品安全国家标准

食品中黄曲霉毒素 M_1 和 B_1 的测定

National food safety standard

Determination of aflatoxins M_1 and B_1 in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5009.24-2003《食品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的测定》。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

——GB/T 5009.24-1985、GB/T 5009.24-1996、GB/T 5009.24-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中黄曲霉毒素M_1和B_1的测定

1 范围

本标准规定了牛乳及其制品、奶油及新鲜猪组织（肝、肾、血及瘦肉）等食品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的测定方法。

本标准适用于牛乳及其制品、奶油及新鲜猪组织（肝、肾、血及瘦肉）等食品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的测定。

2 原理

样品经提取、浓缩、薄层分离后，黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 在紫外光（波长 365nm）下产生蓝紫色荧光，根据其在薄层上显示荧光的最低检出量来测定含量。

3 试剂和材料

3.1 甲醇：分析纯。

3.2 石油醚：分析纯。

3.3 三氯甲烷：分析纯。

3.4 无水硫酸钠：分析纯。

3.5 异丙醇：分析纯。

3.6 硅胶 G：层析用。

3.7 氯化钠及氯化钠溶液（40 g/L）。

3.8 硫酸（1+3）。

3.9 玻璃砂：用酸处理后洗净干燥，约相当 20 目。

3.10 黄曲霉毒素 M_1 标准溶液：用三氯甲烷配制成每毫升相当于 10μg 的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。以三氯甲烷作空白试剂，黄曲霉毒素 M_1 的紫外最大吸收峰的波长应接近 357 nm，摩尔消光系数为 19 950。避光，置于 4 ℃冰箱中保存。

3.11 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 混合标准使用液：用三氯甲烷配制成每毫升相当于各含 0.04 μg 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1。避光，置于 4℃冰箱中保存。

4 仪器和设备

4.1 10 目圆孔筛。

4.2 小型粉碎机。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.3 玻璃板：5 cm×20 cm。

4.4 展开槽：长 25 cm，宽 6 cm，高 4 cm。

4.5 紫外光灯：100 W～125 W，带 365 nm 滤光片。

4.6 微量注射器。

5 分析步骤

整个操作需在暗室条件下进行。

5.1 样品提取

5.1.1 样品提取制备表，见表 1。

表 1 试样制备

样品名称	称样量/（g）	加水量/（mL）	加甲醇量/（mL）	提取液量[α]/（mL）	加 40g/L 氯化钠溶液量/（mL）	浓缩体积/（mL）	滴加体积/（μL）	方法灵敏度/（μg/kg）
牛乳	30	0	90	62	25	0.4	100	0.1
炼乳	30	0	90	52	35	0.4	50	0.2
牛乳粉	15	20	90	59	28	0.4	40	0.5
乳酪	15	5	90	56	31	0.4	40	0.5
奶油	10	45	55	80	0	0.4	40	0.5
猪肝	30	0	90	59	28	0.4	50	0.2
猪肾	30	0	90	61	26	0.4	50	0.2
猪瘦肉	30	0	90	58	29	0.4	50	0.2
猪血	30	0	90	61	26	0.4	50	0.2

[α] 提取液量按式（1）计算：

$$X = \frac{8}{15} \times (90 + A + B) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \quad (1)$$

式中：

X——提取液量，单位为毫升（mL）；

A——试样中的水分量，单位为毫升（mL）（牛乳、炼乳及猪组织的取样量为 30g，牛乳粉、乳酪的取样量为 15g）；

B——加水量，单位为毫升（mL）；

注：样品中的水分量参照《食物成分表》。

因各提取液中含 48 mL 甲醇，需 39 mL 水才能调到甲醇与水之体积比为(55+45)，因此加入 40g/L 的氯化钠溶液的体积等于甲醇和水的总体积（87mL）减去提取液的体积（mL）。

5.1.2 乳与炼乳：称取 30.00 g 混匀的样品，置于小烧杯中，再分别用 90 mL 甲醇移于 300mL 具塞锥形瓶中，盖严防漏。振荡 30 min，用折叠式快速滤纸滤于 100 mL 具塞量筒中。按表 1 收集 62 mL 乳与 52 mL 炼乳（各相当于 16 g 样品）提取液。

5.1.3 乳粉：取 15.00 g 样品，置于具塞锥形瓶中，加入 20 mL 水，使样品湿润后再加入 90 mL 甲醇，以下按 5.1.3 自“振荡 30 min……”起，依法操作，按表 1 收集 59 mL 提取液（相当于 8 g 样品）。

5.1.4 干酪：称取 15.00 g 切细、过 10 目圆孔筛混匀样品，置于具塞锥形瓶中，加 5 mL 水和 90 mL 甲醇，以下按 5.1.3 自“振荡 30 min……”起依法操作，按表 1 收集 56 mL 提取液（相当于 8 g 样品）。

5.1.5 奶油：称取 10.00 g 样品，置于小烧杯中，用 40 mL 石油醚将奶油溶解并移于具塞锥形瓶中。加 45 mL 水和 55 mL 甲醇，振荡 30 min 后，将全部液体移于分液漏斗中。再加入 1.5 g 氯化钠摇动溶

食品伙伴网http://www.foodmate.net

解，待分层后，按上表收集 80 mL 提取液（相当于 8 g 样品）于具塞量筒中。

5.1.6 新鲜猪组织：取新鲜或冷冻保存的猪组织样品（包括肝、肾、血、瘦肉）先切细，混匀后称取 30.00 g，置于小乳钵中，加玻璃砂少许磨细，新鲜全血用打碎机打匀，或用玻璃珠振摇抗凝。混匀后称取 30.00 g，将各样品置于 300 mL 具塞锥形瓶中，加入 90 mL 甲醇，以下按 5.1.3 自“振荡 30 min……”起依法操作。按上表收集 59 mL 猪肝，61 mL 猪肾，58 mL 猪瘦肉及 61 mL 猪血等提取液（各相当于 16 g 样品）。

5.2 净化

5.2.1 用石油醚分配净化：将以上收集的提取液移入 250 mL 分液漏斗中，再按各种食品加入一定体积的氯化钠溶液（40 g/L）（见表 1）。再加入 40 mL 石油醚，振摇 2 min，待分层后，将下层甲醇-氯化钠水层移于原量筒中，将上层石油醚溶液从分液漏斗上口倒出，弃去。再将量筒中溶液转移于原分液漏斗中。再重复用石油醚提取两次，每次 30 mL，最后将量筒中溶液仍移于分液漏斗中。奶油样液总共用石油醚提取两次，每次 40 mL。

5.2.2 用三氯甲烷分配提取：于原量筒中加入 20 mL 三氯甲烷，摇匀后，再倒入原分液漏斗中，振摇 2 min。待分层后，将下层三氯甲烷移于原量筒中，再重复用三氯甲烷提取两次，每次 10 mL 合并于原量筒中。弃去上层甲醇水溶液。

5.2.3 用水洗三氯甲烷层与浓缩制备：将合并后的三氯甲烷层倒回原分液漏斗中，加入 30 mL 氯化钠溶液（40 g/L），振摇 30 s，静置。待上层混浊液有部分澄清时，即可将下层三氯甲烷层收集于原量筒中。加入 10 g 无水硫酸钠，振摇放置澄清后，将此液经装有少许无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于 100 mL 蒸发皿中。氯化钠水层用 10 mL 三氯甲烷提取一次，并经过滤器一并滤于蒸发皿中。最后将无水硫酸钠也一起倒于滤纸上，用少量三氯甲烷洗量筒与无水硫酸钠，也一并滤于蒸发皿中，于 65 ℃水浴上通风挥干，用三氯甲烷将蒸发皿中残留物转移于浓缩管中，蒸发皿中残渣太多，则经滤纸滤入浓缩管中。于 65 ℃用减压吹气法将此液浓缩至 0.4 mL 以下，再用少量三氯甲烷洗管壁后，浓缩定量至 0.4 mL 备用。

5.3 测定

5.3.1 硅胶 G 薄层板的制备

薄层板厚度为 0.3 mm，105 ℃活化 2 h，在干燥器内可保存 1d～2d。

5.3.2 点板

取薄层板（5 cm×20 cm）两块，距板下端 3 cm 的基线上各滴加两点，在距第一与第二板的左边缘 0.8 cm～1 cm 处各滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 混合标准使用液，在距各板左边缘 2.8 cm～3 cm 处各滴加同一样液点（各种食品的滴加体积见表 1），在第二板的第 2 点上再滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 混合标准使用液。一般可将薄层板放在盛有干燥硅胶的层析槽内进行滴加，边加边用冷风机冷风吹干。

5.3.3 展开

5.3.3.1 横展：在槽内加入 15 mL 事先用无水硫酸钠脱水的无水乙醚（每 500 mL 无水乙醚中加 20 g 无水硫酸钠）。将薄层板靠近标准点的长边置于槽内，展至板端后，取出挥干，再同上继续展开一次。

5.3.3.2 纵展：将横展两次挥干后的薄层板再用异丙醇-丙酮-苯-正己烷-石油醚（沸程 60 ℃～90 ℃）-三氯甲烷（5+10+10+10+10+55）混合展开剂纵展至前沿距原点距离为 10 cm～12 cm 取出挥干。

5.3.3.3 横展：将纵展挥干后的板再用乙醚横展 1 次～2 次，展开方法同 5.3.3.1。

5.3.4 观察与评定结果

5.3.4.1 在紫外光灯下将第一、二板相互比较观察，若第二板的第二点在黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 标准点的相应处出现最低检出量（M_1 与 B_1 的比移值依次为 0.25 和 0.43），而在第一板相同位置上未出现荧光

食品伙伴网http://www.foodmate.net

点，则样品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 含量在其所定的方法灵敏度以下（见表 1）。

5.3.4.2 如果第一板的相同位置上出现黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的荧光点，则第二板第二点的样液点是否各与滴加的标准点重叠，如果重叠，再进行以下的定量与确证试验。

5.3.5 稀释定量

样液中的黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 荧光点的荧光强度与黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的最低检出量（0.0004 μg）的荧光强度一致，则乳、炼乳、乳粉、干酪与奶油样品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的含量依次为 0.1 μg/kg、0.2 μg/kg、0.5 μg/kg、0.5 μg/kg 及 0.5 μg/kg；新鲜猪组织（肝、肾、血、瘦肉）样品均为 0.2 μg/kg（见表 1）。如样液中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的荧光强度比最低检出量强，则根据其强度逐一进行测定，估计减少滴加微升数或经稀释后再滴加不同微升数，直至样液点的荧光强度与最低检出量点的荧光强度一致为止。

5.3.6 确证试验

在做完定性或定量的薄层板上，将要确证的黄曲霉毒素 M_1 和 B_1 的点用大头针圈出。喷以硫酸溶液(1+3)，放置 5 min 后，在紫外光灯下观察，若样液中黄曲霉毒素 M_1 和 B_1 点与标准点一样均变为黄色荧光，则进一步确证检出的荧光点是黄曲霉毒素 M_1 和 B_1。

6 分析结果的表述

黄曲霉毒素 M_1 或 B_1 的含量按式（2）进行计算。

$$X = 0.0004 \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1000}{m} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——黄曲霉毒素 M_1 或 B_1 含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

V_1——样液浓缩后体积，单位为毫升(mL)；

V_2——出现最低荧光样液的滴加体积，单位为毫升(mL)；

D——浓缩样液的总稀释倍数；

m——浓缩样液中所相当的试样质量，单位为克(g)；

0.0004——黄曲霉毒素 M_1 或 B_1 的最低检出量，单位为微克（μg）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.33—2010

食品安全国家标准
食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定

National food safety standard

Determination of nitrite and nitrate in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5009.33-2008 《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》。

本标准与 GB/T 5009.33-2008 相比，主要变化如下：

——第一法中增加粉状婴幼儿配方食品的淋洗条件；

——删除第三法示波极谱法，增加“乳及乳制品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定”作为第三法。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5009.33-1985、GB/T 5009.33-1996、GB/T 5009.33-2003、GB/T 5009.33-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定

1 范围

本标准规定了食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定方法。

本标准适用于食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定。

第一法 离子色谱法

2 原理

试样经沉淀蛋白质、除去脂肪后，采用相应的方法提取和净化，以氢氧化钾溶液为淋洗液，阴离子交换柱分离，电导检测器检测。以保留时间定性，外标法定量。

3 试剂和材料

3.1 超纯水：电阻率＞18.2 MΩ•cm。

3.2 乙酸（CH_3COOH）：分析纯。

3.3 氢氧化钾（KOH）：分析纯。

3.4 乙酸溶液（3 %）：量取乙酸（3.2）3 mL 于 100 mL 容量瓶中，以水稀释至刻度，混匀。

3.5 亚硝酸根离子（NO_2^-）标准溶液（100 mg/L，水基体）。

3.6 硝酸根离子（NO_3^-）标准溶液（1000 mg/L，水基体）。

3.7 亚硝酸盐（以 NO_2^-计，下同）和硝酸盐（以 NO_3^-计，下同）混合标准使用液：准确移取亚硝酸根离子（NO_2^-）和硝酸根离子（NO_3^-）的标准溶液各 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，此溶液每 1 L 含亚硝酸根离子 1.0 mg 和硝酸根离子 10.0 mg。

4 仪器和设备

4.1 离子色谱仪：包括电导检测器，配有抑制器，高容量阴离子交换柱，50 μL 定量环。

4.2 食物粉碎机。

4.3 超声波清洗器。

4.4 天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.5 离心机：转速≥10000 转/分钟，配 5 mL 或 10 mL 离心管。

4.6 0.22 μm 水性滤膜针头滤器。

4.7 净化柱：包括 C_{18} 柱、Ag 柱和 Na 柱或等效柱。

4.8 注射器：1.0 mL 和 2.5 mL。

注：所有玻璃器皿使用前均需依次用 2 mol/L 氢氧化钾和水分别浸泡 4 h，然后用水冲洗 3 次～5 次，晾干备用。

5 分析步骤

5.1 试样预处理

5.1.1 新鲜蔬菜、水果：将试样用去离子水洗净，晾干后，取可食部切碎混匀。将切碎的样品用四分法取适量，用食物粉碎机制成匀浆备用。如需加水应记录加水量。

5.1.2 肉类、蛋、水产及其制品：用四分法取适量或取全部，用食物粉碎机制成匀浆备用。

5.1.3 乳粉、豆奶粉、婴儿配方粉等固态乳制品(不包括干酪)：将试样装入能够容纳 2 倍试样体积的带盖容器中，通过反复摇晃和颠倒容器使样品充分混匀直到使试样均一化。

5.1.4 发酵乳、乳、炼乳及其他液体乳制品：通过搅拌或反复摇晃和颠倒容器使试样充分混匀。

5.1.5 干酪：取适量的样品研磨成均匀的泥浆状。为避免水分损失，研磨过程中应避免产生过多的热量。

5.2 提取

5.2.1 水果、蔬菜、鱼类、肉类、蛋类及其制品等：称取试样匀浆 5 g（精确至 0.01 g，可适当调整试样的取样量，以下相同），以 80 mL 水洗入 100 mL 容量瓶中，超声提取 30 min，每隔 5 min 振摇一次，保持固相完全分散。于 75 ℃水浴中放置 5 min，取出放置至室温，加水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤后，取部分溶液于 10 000 转/分钟离心 15 min，上清液备用。

5.2.2 腌鱼类、腌肉类及其它腌制品：称取试样匀浆 2 g（精确至 0.01 g），以 80 mL 水洗入 100 mL 容量瓶中，超声提取 30 min，每 5 min 振摇一次，保持固相完全分散。于 75 ℃水浴中放置 5 min，取出放置至室温，加水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤后，取部分溶液于 10 000 转/分钟离心 15 min，上清液备用。

5.2.3 乳：称取试样 10 g（精确至 0.01 g），置于 100 mL 容量瓶中，加水 80 mL，摇匀，超声 30 min，加入 3 %乙酸溶液 2 mL，于 4 ℃放置 20 min，取出放置至室温，加水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤，取上清液备用。

5.2.4 乳粉：称取试样 2.5 g（精确至 0.01 g），置于 100 mL 容量瓶中，加水 80 mL，摇匀，超声 30 min，加入 3 %乙酸溶液 2 mL，于 4 ℃放置 20 min，取出放置至室温，加水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤，取上清液备用。

5.2.5 取上述备用的上清液约 15 mL，通过 0.22 μm 水性滤膜针头滤器、C_{18} 柱，弃去前面 3 mL（如果氯离子大于 100 mg/L，则需要依次通过针头滤器、C_{18} 柱、Ag 柱和 Na 柱，弃去前面 7 mL），收集后面洗脱液待测。

固相萃取柱使用前需进行活化，如使用 OnGuard II RP 柱（1.0 mL）、OnGuard II Ag 柱（1.0 mL）和 OnGuard II Na 柱（1.0 mL）[1]，其活化过程为：OnGuard II RP 柱（1.0 mL）使用前依次用 10 mL 甲醇、15 mL 水通过，静置活化 30 min。OnGuard II Ag 柱（1.0 mL）和 OnGuard II Na 柱（1.0 mL）用 10

[1]给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

mL 水通过，静置活化 30 min。

5.3 参考色谱条件

5.3.1 色谱柱：氢氧化物选择性，可兼容梯度洗脱的高容量阴离子交换柱，如 Dionex IonPac AS11-HC 4 mm×250 mm（带 IonPac AG11-HC 型保护柱 4 mm×50 mm）[1]，或性能相当的离子色谱柱。

5.3.2 淋洗液

5.3.2.1 一般试样：氢氧化钾溶液，浓度为 6 mmol/L～70 mmol/L；洗脱梯度为 6 mmol/L 30 min，70 mmol/L 5 min，6 mmol/L 5 min； 流速 1.0 mL/min。

5.3.2.2 粉状婴幼儿配方食品：氢氧化钾溶液，浓度为 5 mmol/L～50 mmol/L；洗脱梯度为 5 mmol/L 33 min， 50 mmol/L 5min，5 mmol/L 5 min；流速 1.3 mL/min。

5.3.3 抑制器：连续自动再生膜阴离子抑制器或等效抑制装置。

5.3.4 检测器：电导检测器，检测池温度为 35 ℃。

5.3.5 进样体积：50 μL（可根据试样中被测离子含量进行调整）。

5.4 测定

5.4.1 标准曲线

移取亚硝酸盐和硝酸盐混合标准使用液，加水稀释，制成系列标准溶液，含亚硝酸根离子浓度为 0.00 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L、0.06 mg/L、0.08 mg/L、0.10 mg/L、0.15 mg/L、0.20 mg/L；硝酸根离子浓度为 0.0 mg/L、0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.6 mg/L、0.8 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L 的混合标准溶液，从低到高浓度依次进样。得到上述各浓度标准溶液的色谱图（图 1）。以亚硝酸根离子或硝酸根离子的浓度（mg/L）为横坐标，以峰高（μS）或峰面积为纵坐标，绘制标准曲线或计算线性回归方程。

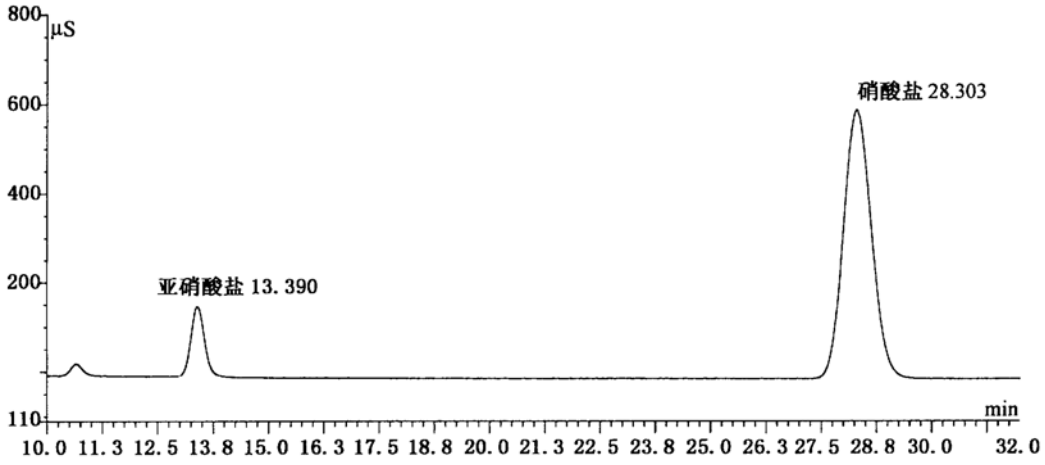


图 1 亚硝酸盐和硝酸盐混合标准溶液的色谱图

5.4.2 样品测定

分别吸取空白和试样溶液 50 μL，在相同工作条件下，依次注入离子色谱仪中，记录色谱图。根据保留时间定性，分别测量空白和样品的峰高（μS）或峰面积。

6 分析结果的表述

试样中亚硝酸盐（以 NO_2^-计）或硝酸盐（以 NO_3^-计）含量按式（1）计算：

食品伙伴网http://www.foodmate.net

$$X=\frac{(c-c_0)\times V\times f\times 1000}{m\times 1000} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X——试样中亚硝酸根离子或硝酸根离子的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c——测定用试样溶液中的亚硝酸根离子或硝酸根离子浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

c_0——试剂空白液中亚硝酸根离子或硝酸根离子的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f——试样溶液稀释倍数；

m——试样取样量，单位为克（g）。

说明：试样中测得的亚硝酸根离子含量乘以换算系数 1.5，即得亚硝酸盐（按亚硝酸钠计）含量；试样中测得的硝酸根离子含量乘以换算系数 1.37，即得硝酸盐（按硝酸钠计）含量。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对值差不得超过算术平均值的 10 %。

第二法 分光光度法

8 原理

亚硝酸盐采用盐酸萘乙二胺法测定，硝酸盐采用镉柱还原法测定。

试样经沉淀蛋白质、除去脂肪后，在弱酸条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，再与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色染料，外标法测得亚硝酸盐含量。采用镉柱将硝酸盐还原成亚硝酸盐，测得亚硝酸盐总量，由此总量减去亚硝酸盐含量，即得试样中硝酸盐含量。

9 试剂和材料

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

9.1 亚铁氰化钾（$K_4Fe(CN)_6\cdot 3H_2O$）。

9.2 乙酸锌（$Zn(CH_3COO)_2\cdot 2H_2O$）。

9.3 冰醋酸（CH_3COOH）。

9.4 硼酸钠（$Na_2B_4O_7\cdot 10H_2O$）。

9.5 盐酸（ρ＝1.19 g/mL）。

9.6 氨水（25 %）。

9.7 对氨基苯磺酸（$C_6H_7NO_3S$）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

9.8 盐酸萘乙二胺($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$)。

9.9 亚硝酸钠（$NaNO_2$）。

9.10 硝酸钠（$NaNO_3$）。

9.11 锌皮或锌棒。

9.12 硫酸镉。

9.13 亚铁氰化钾溶液(106 g/L)：称取 106.0 g 亚铁氰化钾（9.1），用水溶解，并稀释至 1000 mL。

9.14 乙酸锌溶液(220 g/L)： 称取 220.0 g 乙酸锌（9.2），先加 30 mL 冰醋酸（9.3）溶解，用水稀释至 1000 mL。

9.15 饱和硼砂溶液(50 g/L)： 称取 5.0 g 硼酸钠（9.4），溶于 100 mL 热水中，冷却后备用。

9.16 氨缓冲溶液（pH 9.6～9.7)：量取 30 mL 盐酸（9.5），加 100 mL 水，混匀后加 65 mL 氨水（9.6），再加水稀释至 1000 mL，混匀。调节 pH 至 9.6～9.7。

9.17 氨缓冲液的稀释液：量取 50 mL 氨缓冲溶液（9.16），加水稀释至 500 mL，混匀。

9.18 盐酸(0.1 mol/L)： 量取 5 mL 盐酸，用水稀释至 600 mL。

9.19 对氨基苯磺酸溶液（4 g/L)：称取 0.4 g 对氨基苯磺酸（9.7），溶于 100 mL 20 %（V/V）盐酸中，置棕色瓶中混匀，避光保存。

9.20 盐酸萘乙二胺溶液（2 g/L)：称取 0.2 g 盐酸萘乙二胺（9.8），溶于 100 mL 水中, 混匀后，置棕色瓶中，避光保存。

9.21 亚硝酸钠标准溶液（200 μg /mL)：准确称取 0.1000 g 于 110℃～120℃干燥恒重的亚硝酸钠，加水溶解移入 500 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。

9.22 亚硝酸钠标准使用液（5.0 μg/mL)：临用前，吸取亚硝酸钠标准溶液 5.00 mL，置于 200 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。

9.23 硝酸钠标准溶液（200 μg/mL，以亚硝酸钠计)：准确称取 0.1232 g 于 110 ℃～120 ℃干燥恒重的硝酸钠，加水溶解，移于入 500 mL 容量瓶中，并稀释至刻度。

9.24 硝酸钠标准使用液（5 μg/mL)：临用时吸取硝酸钠标准溶液 2.50 mL，置于 100 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。

10 仪器和设备

10.1 天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.2 组织捣碎机。

10.3 超声波清洗器。

10.4 恒温干燥箱。

10.5 分光光度计。

10.6 镉柱

10.6.1 海绵状镉的制备：投入足够的锌皮或锌棒于 500 mL 硫酸镉溶液(200 g/L)中，经过 3 h～4 h，当其中的镉全部被锌置换后，用玻璃棒轻轻刮下，取出残余锌棒，使镉沉底，倾去上层清液，以水用倾泻法多次洗涤，然后移入组织捣碎机中，加 500 mL 水，捣碎约 2 s，用水将金属细粒洗至标准筛上，取 20 目～40 目之间的部分。

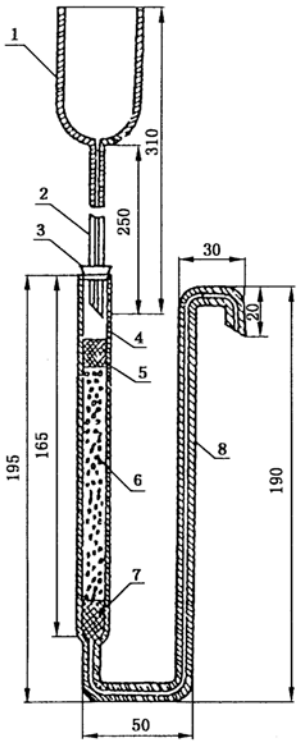
10.6.2 镉柱的装填：如图 2。用水装满镉柱玻璃管，并装入 2 cm 高的玻璃棉做垫，将玻璃棉压向柱底时，应将其中所包含的空气全部排出，在轻轻敲击下加入海绵状镉至 8 cm～10 cm 高，上面用 1 cm 高的玻璃棉覆盖，上置一贮液漏斗，末端要穿过橡皮塞与镉柱玻璃管紧密连接。

如无上述镉柱玻璃管时，可以 25 mL 酸式滴定管代用，但过柱时要注意始终保持液面在镉层之上。

当镉柱填装好后，先用 25 mL 盐酸(0.1 mol/L)洗涤，再以水洗两次，每次 25 mL，镉柱不用时用水封盖，随时都要保持水平面在镉层之上，不得使镉层夹有气泡。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

单位为毫米



1——贮液漏斗，内径 35 mm，外径 37 mm；
2——进液毛细管，内径 0.4 mm，外径 6 mm；
3——橡皮塞；
4——镉柱玻璃管，内径 12 mm，外径 16 mm；
5、7——玻璃棉；
6——海绵状镉；
8——出液毛细管，内径 2 mm，外径 8 mm。

图 2　镉柱示意图

10.6.3 镉柱每次使用完毕后，应先以 25 mL 盐酸（0.1 mol/L）洗涤，再以水洗两次，每次 25 mL，最后用水覆盖镉柱。

10.6.4 镉柱还原效率的测定：吸取 20 mL 硝酸钠标准使用液，加入 5 mL 氨缓冲液的稀释液，混匀后注入贮液漏斗，使流经镉柱还原，以原烧杯收集流出液，当贮液漏斗中的样液流完后，再加 5 mL 水置换柱内留存的样液。取 10.0 mL 还原后的溶液（相当 10 μg 亚硝酸钠）于 50 mL 比色管中，以下按 11.4 自“吸取 0.00 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80mL、1.00mL……”起依法操作，根据标准曲线计算测得结果，与加入量一致，还原效率应大于 98%为符合要求。

10.6.5 还原效率计算

还原效率按式（2）进行计算。

$$X = \frac{A}{10} \times 100\% \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——还原效率，%；

A——测得亚硝酸钠的含量，单位为微克（μg）；

10——测定用溶液相当亚硝酸钠的含量，单位为微克（μg）。

11　分析步骤

食品伙伴网http://www.foodmate.net

11.1 试样的预处理

同 5.1。

11.2 提取

称取 5 g（精确至 0.01 g）制成匀浆的试样（如制备过程中加水，应按加水量折算），置于 50 mL 烧杯中，加 12.5 mL 饱和硼砂溶液（9.15），搅拌均匀，以 70 ℃左右的水约 300 mL 将试样洗入 500 mL 容量瓶中，于沸水浴中加热 15 min，取出置冷水浴中冷却，并放置至室温。

11.3 提取液净化

在振荡上述提取液时加入 5 mL 亚铁氰化钾溶液（9.13），摇匀，再加入 5 mL 乙酸锌溶液（9.14），以沉淀蛋白质。加水至刻度，摇匀，放置 30 min，除去上层脂肪，上清液用滤纸过滤，弃去初滤液 30 mL，滤液备用。

11.4 亚硝酸盐的测定

吸取 40.0 mL 上述滤液于 50 mL 带塞比色管中，另吸取 0.00 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00 mL、2.50 mL 亚硝酸钠标准使用液（相当于 0.0 μg、1.0 μg、2.0 μg、3.0 μg、4.0 μg、5.0 μg、7.5 μg、10.0 μg、12.5 μg 亚硝酸钠），分别置于 50 mL 带塞比色管中。于标准管与试样管中分别加入 2 mL 对氨基苯磺酸溶液（9.19），混匀，静置 3 min～5 min 后各加入 1 mL 盐酸萘乙二胺溶液(9.20)，加水至刻度，混匀，静置 15 min，用 2 cm 比色杯，以零管调节零点，于波长 538 nm 处测吸光度，绘制标准曲线比较。同时做试剂空白。

11.5 硝酸盐的测定

11.5.1 镉柱还原

11.5.1.1先以 25 mL 稀氨缓冲液（9.17）冲洗镉柱，流速控制在 3 mL/min～5 mL/min（以滴定管代替的可控制在 2 mL/min～3 mL/min）。

11.5.1.2吸取 20 mL 滤液于 50 mL 烧杯中，加 5 mL 氨缓冲溶液（9.16），混合后注入贮液漏斗，使流经镉柱还原，以原烧杯收集流出液，当贮液漏斗中的样液流尽后，再加 5 mL 水置换柱内留存的样液。

11.5.1.3将全部收集液如前再经镉柱还原一次，第二次流出液收集于 100 mL 容量瓶中，继以水流经镉柱洗涤三次，每次 20 mL，洗液一并收集于同一容量瓶中，加水至刻度，混匀。

11.5.2 亚硝酸钠总量的测定

吸取 10 mL～20 mL 还原后的样液于 50 mL 比色管中。以下按 11.4 自“吸取 0.00 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL……”起依法操作。

12 分析结果的表述

12.1 亚硝酸盐含量计算

亚硝酸盐（以亚硝酸钠计）的含量按式（3）进行计算。

$$X_1=\frac{A_1\times 1000}{m\times\frac{V_1}{V_0}\times 1000} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X_1——试样中亚硝酸钠的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A_1——测定用样液中亚硝酸钠的质量，单位为微克（μg）；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

m——试样质量，单位为克（g）；
V_1——测定用样液体积，单位为毫升（mL）；
V_0——试样处理液总体积，单位为毫升（mL）。
以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

12.2 硝酸盐含量的计算

硝酸盐（以硝酸钠计）的含量按式（4）进行计算。

$$X_2=\left(\frac{A_2\times 1000}{m\times\frac{V_2}{V_0}\times\frac{V_4}{V_3}\times 1000}-X_1\right)\times 1.232 \quad\cdots\cdots(4)$$

式中：
X_2——试样中硝酸钠的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
A_2——经镉粉还原后测得总亚硝酸钠的质量，单位为微克（μg）；
m——试样的质量，单位为克（g）；
1.232——亚硝酸钠换算成硝酸钠的系数；
V_2——测总亚硝酸钠的测定用样液体积，单位为毫升（mL）；
V_0——试样处理液总体积，单位为毫升（mL）；
V_3——经镉柱还原后样液总体积，单位为毫升（mL）；
V_4——经镉柱还原后样液的测定用体积，单位为毫升（mL）；
X_1——由式（3）计算出的试样中亚硝酸钠的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）。
以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

13 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第三法 乳及乳制品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定

14 原理

试样经沉淀蛋白质、除去脂肪后，用镀铜镉粒使部分滤液中的硝酸盐还原为亚硝酸盐。在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 538 nm 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总量；从两者之间的差值可以计算出硝酸盐的含量。

15 试剂和材料

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（16.10）中混入小气泡，柱制备（17.1）、柱还原能力的检查（17.2）和柱再生（17.3）时所用的蒸馏水或去离子水最好是刚沸过并冷却至室温的。

15.1 亚硝酸钠（$NaNO_2$）。

15.2 硝酸钾（KNO_3）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

15.3 镀铜镉柱

镉粒直径 0.3 mm～0.8 mm。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（$CdSO_4·8H_2O$）溶液浸没锌棒。在 24 h 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 次～3 次，然后把镉移入小型搅拌器中，同时加入 400 mL 0.1 mol/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，静置几小时，这期间要搅拌几次以除掉气泡。倾出大部分溶液，立即按 17.1.1 至 17.1.8 中叙述的方法镀铜。

15.4 硫酸铜溶液：溶解 20 g 硫酸铜（$CuSO_4·5H_2O$）于水中，稀释至 1000 mL。

15.5 盐酸-氨水缓冲溶液：pH 9.60～9.70。用 600 mL 水稀释 75 mL 浓盐酸（质量分数为 36 %～38 %）。混匀后，再加入 135 mL 浓氨水（质量分数等于 25 %的新鲜氨水）。用水稀释至 1000 mL，混匀。用精密 pH 计调 pH 值为 9.60～9.70。

15.6 盐酸(2 mol/L)：160 mL 的浓盐酸（质量分数为 36 %～38 %）用水稀释至 1000 mL。

15.7 盐酸（0.1 mol/L）：50 mL 2 mol/L 的盐酸用水稀释至 1000 mL。

15.8 沉淀蛋白和脂肪的溶液：

15.8.1 硫酸锌溶液：将 53.5 g 的硫酸锌（$ZnSO_4·7H_2O$）溶于水中，并稀释至 100 mL。

15.8.2 亚铁氰化钾溶液：将 17.2 g 的三水亚铁氰化钾[$K_4Fe(CN)_6·3H_2O$]溶于水中，稀释至 100 mL。

15.9 EDTA 溶液：用水将 33.5 g 的乙二胺四乙酸二钠（$Na_2C_{10}H_{14}N_2O_3·2H_2O$）溶解，稀释至 1000 mL。

15.10 显色液 1：体积比为 450: 550 的盐酸。将 450 mL 浓盐酸（质量分数为 36 %～38 %）加入到 550 mL 水中，冷却后装入试剂瓶中。

15.11 显色液 2：5 g/L 的磺胺溶液。在 75 mL 水中加入 5 mL 浓盐酸（质量分数为 36 %～38 %），然后在水浴上加热，用其溶解 0.5 g 磺胺（$NH_2C_6H_4SO_2NH_2$）。冷却至室温后用水稀释至 100 mL。必要时进行过滤。

15.12 显色液 3：1 g/L 的萘胺盐酸盐溶液。将 0.1 g 的 N-1-萘基-乙二胺二盐酸盐（$C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2·2HCl$）溶于水，稀释至 100 mL。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。

15.13 亚硝酸钠标准溶液：相当于亚硝酸根的浓度为 0.001 g/L。

将亚硝酸钠在 110 ℃～120 ℃的范围内干燥至恒重。冷却后称取 0.150 g，溶于 1000 mL 容量瓶中，用水定容。在使用的当天配制该溶液。

取 10 mL 上述溶液和 20 mL 缓冲溶液（15.5）于 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

每 1 mL 该标准溶液中含 1.00 μg 的 NO_2^-。

15.14 硝酸钾标准溶液，相当于硝酸根的浓度为 0.0045 g/L。

将硝酸钾在 110 ℃～120 ℃的温度范围内干燥至恒重，冷却后称取 1.4580 g，溶于 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

在使用当天，于 1000 mL 的容量瓶中，取 5 mL 上述溶液和 20 mL 缓冲溶液（15.5），用水定容。每 1 mL 的该标准溶液含有 4.50 μg 的 NO_3^-。

16 仪器和设备

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。

16.1 天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。

16.2 烧杯：100 mL。

16.3 锥形瓶：250 mL，500 mL。

16.4 容量瓶：100 mL、500 mL 和 1000 mL。

16.5 移液管：2 mL、5 mL、10 mL 和 20 mL。

16.6 吸量管：2 mL、5 mL、10 mL 和 25 mL。

16.7 量筒：根据需要选取。

16.8 玻璃漏斗：直径约 9 cm，短颈。

16.9 定性滤纸：直径约 18 cm。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

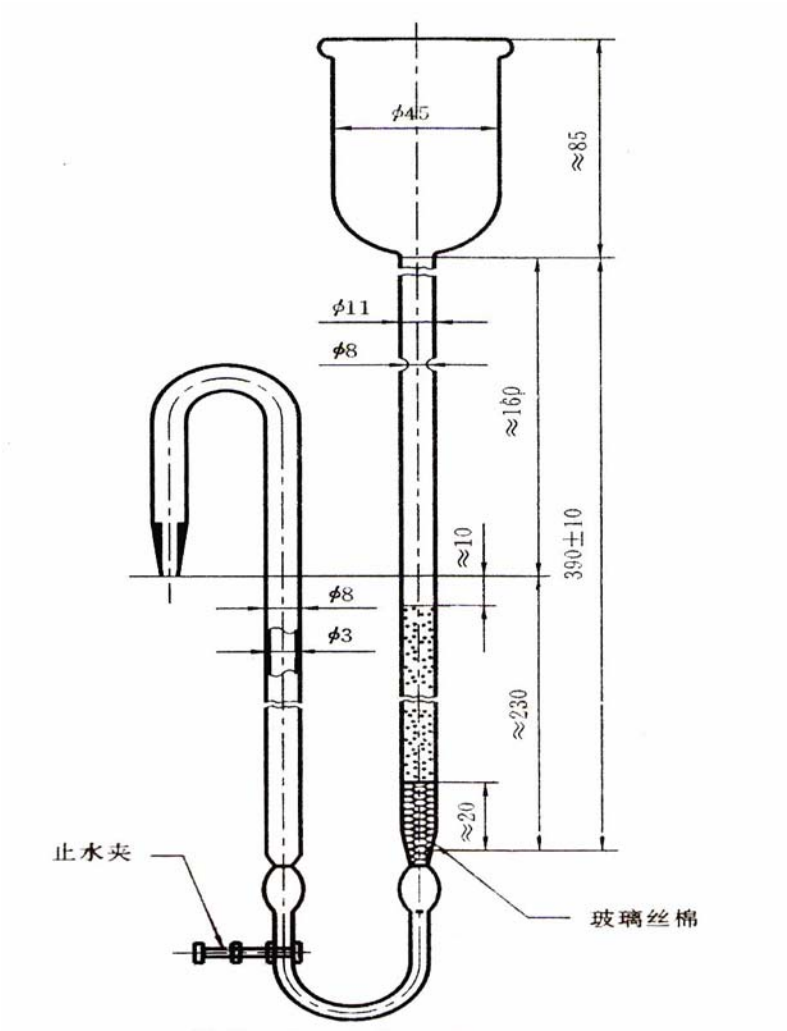


图 3 硝酸盐还原装置

16.10 还原反应柱：简称镉柱，如图 3 所示。

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

16.12 pH 计：精度为± 0.01，使用前用 pH 7 和 pH 9 的标准溶液进行校正。

17 分析步骤

17.1 制备镀铜镉柱

17.1.1 置镉粒（15.3）于锥形瓶（16.3）中（所用镉粒的量以达到要求的镉柱高度为准）。

17.1.2 加足量的盐酸（15.6）以浸没镉粒，摇晃几分钟。

17.1.3 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。

17.1.4 在镉粒上镀铜。向镉粒中加入硫酸铜溶液（15.4）（每克镉粒约需 2.5 mL），振荡 1 min。

17.1.5 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。

17.1.6 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 3）。在玻璃柱中灌入水，排净气泡。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

17.1.7 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 cm～20 cm 的范围内。

注 1： 避免在颗粒之间遗留空气。

注 2： 注意不能让液面低于镀铜镉粒的顶部。

17.1.8 新制备柱的处理。将由 750 mL 水、225 mL 硝酸钾标准溶液（15.14）、20 mL 缓冲溶液（15.5）和 20 mLEDTA 溶液（15.9）组成的混合液以不大于 6 mL/min 的流量通过刚装好镉粒的玻璃柱，接着用 50 mL 水以同样流速冲洗该柱。

17.2 检查柱的还原能力

每天至少要进行两次，一般在开始时和一系列测定之后。

17.2.1 用移液管将 20 mL 的硝酸钾标准溶液（15.14）移入还原柱顶部的贮液杯中，再立即向该贮液杯中添加 5 mL 缓冲溶液(15.5)。用一个 100 mL 的容量瓶收集洗提液。洗提液的流量不应超过 6 mL/min。

17.2.2 在贮液杯将要排空时，用约 15 mL 水冲洗杯壁。冲洗水流尽后，再用 15 mL 水重复冲洗。当第二次冲洗水也流尽后，将贮液杯灌满水，并使其以最大流量流过柱子。

17.2.3 当容量瓶中的洗提液接近 100 mL 时，从柱子下取出容量瓶，用水定容至刻度，混合均匀。

17.2.4 移取 10 mL 洗提液于 100 mL 容量瓶中，加水至 60 mL 左右。然后按 17.8.2 和 17.8.4 操作。

17.2.5 根据测得的吸光度，从标准曲线（17.8.5）上可查得稀释洗提液（17.2.4）中的亚硝酸盐含量（μg/mL）。据此可计算出以百分率表示的柱还原能力（NO_2^-的含量为 0.067 μg/mL 时还原能力为 100 %）。如果还原能力小于 95 %，柱子就需要再生。

17.3 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。

17.3.1 在 100 mL 水中加入约 5 mLEDTA 溶液（15.9）和 2 mL 盐酸（15.7），以 10 mL/min 左右的速度过柱。

17.3.2 当贮液杯中混合液排空后，按顺序用 25 mL 水、25 mL 盐酸（15.7）和 25 mL 水冲洗柱子。

17.3.3 检查镉柱的还原能力，如低于 95%，要重复再生。

17.4 样品的称取和溶解

17.4.1 液体乳样品：量取 90 mL 样品于 500 mL 锥形瓶中，用 22 mL 50 ℃～55 ℃的水分数次冲洗样品量筒，冲洗液倾入锥形瓶中，混匀。

17.4.2 乳粉样品：在 100 mL 烧杯中称取 10 g 样品，准确至 0.001 g。用 112 mL 50 ℃～55 ℃的水将样品洗入 500 mL 锥形瓶中，混匀。

17.4.3 乳清粉及以乳清粉为原料生产的粉状婴幼儿配方食品样品：在 100 mL 烧杯中称取 10 g 样品，准确至 0.001 g。用 112 mL 50 ℃～55 ℃的水将样品洗入 500 mL 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 15 min，然后冷却至约 50 ℃。

17.5 脂肪和蛋白的去除

17.5.1 按顺序加入 24 mL 硫酸锌溶液（15.8.1）、24 mL 亚铁氰化钾溶液（15.8.2）和 40 mL 缓冲溶液（15.5），加入时要边加边摇，每加完一种溶液都要充分摇匀。

17.5.2 静置 15 min～1 h。然后用滤纸（16.9）过滤，滤液用 250 mL 锥形瓶收集。

17.6 硝酸盐还原为亚硝酸盐

17.6.1 移取 20 mL 滤液于 100 mL 小烧杯中，加入 5 mL 缓冲溶液（15.5），摇匀，倒入镉柱顶部的贮液杯中，以小于 6 mL/min 的流速过柱。洗提液（过柱后的液体）接入 100 mL 容量瓶中。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

17.6.2　当贮液杯快要排空时，用 15 mL 水冲洗小烧杯，再倒入贮液杯中。冲洗水流完后，再用 15 mL 水重复一次。当第二次冲洗水快流尽时，将贮液杯装满水，以最大流速过柱。

17.6.3　当容量瓶中的洗提液接近 100 mL 时，取出容量瓶，用水定容，混匀。

17.7 测定

17.7.1　分别移取 20 mL 洗提液（17.6.3）和 20 mL 滤液（17.5.2）于 100 mL 容量瓶中，加水至约 60 mL。

17.7.2　在每个容量瓶中先加入 6 mL 显色液 1（15.10），边加边混；再加入 5 mL 显色液 2（15.11）。小心混合溶液，使其在室温下静置 5 min，避免直射阳光。

17.7.3　加入 2 mL 显色液 3（15.12），小心混合，使其在室温下静置 5 min，避免直射阳光。用水定容至刻度，混匀。

17.7.4　在 15 min 内用 538 nm 波长，以空白试验液体为对照测定上述样品溶液的吸光度。

17.8 标准曲线的制作

17.8.1　分别移取（或用滴定管放出）0 mL、2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL、12 mL、16 mL 和 20 mL 亚硝酸钠标准溶液（15.13）于 9 个 100 mL 容量瓶中。在每个容量瓶中加水，使其体积约为 60 mL。

17.8.2　在每个容量瓶中先加入 6 mL 显色液 1（15.10），边加边混；再加入 5 mL 显色液 2（15.11）。小心混合溶液，使其在室温下静置 5 min，避免直射阳光。

17.8.3　加入 2 mL 显色液 3（15.12），小心混合，使其在室温下静置 5 min，避免直射阳光。用水定容至刻度，混匀。

17.8.4　在 15 min 内，用 538 nm 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。

17.8.5　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 μg/100 mL 表示。

18　分析结果的表述

18.1 亚硝酸盐含量

样品中亚硝酸根含量按式（5）计算：

$$X = \frac{20000 \times c_1}{m \times V_1} \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

X——样品中亚硝酸根含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

c_1——根据滤液（17.5.2）的吸光度（17.7.4），从标准曲线上读取的 NO_2^-的浓度，单位为微克每百毫升（μg/100mL）；

m——样品的质量（液体乳的样品质量为 90×1.030g），单位为克（g）；

V_1——所取滤液（17.5.2）的体积（17.7.1），单位为毫升（mL）。

样品中以亚硝酸钠表示的亚硝酸盐含量，按式（6）计算：

$$W(NaNO_2) = 1.5 \times W(NO_2^-) \quad \cdots\cdots (6)$$

式中：

$W(NO_2^-)$——样品中亚硝酸根的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

$W(NaNO_2)$——样品中以亚硝酸钠表示的亚硝酸盐的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

18.2 硝酸盐含量

样品中硝酸根含量按式（7）计算：

$$X = 1.35 \times \left[\frac{100000 \times c_2}{m \times V_2} - W\left(NO_2^-\right) \right] \cdots\cdots (7)$$

式中：

X——样品中硝酸根含量（mg/kg）；

c_2——根据洗提液（17.6.3）的吸光度（17.7.4），从标准曲线上读取的亚硝酸根离子浓度，单位为微克每百毫升（μg/100mL）；

m——样品的质量，单位为克（g）；

V_2——所取洗提液（17.6.3）的体积（17.7.1），单位为毫升（mL）；

$W（NO_2^-）$——根据式（5）计算出的亚硝酸根含量。

若考虑柱的还原能力，样品中硝酸根含量按式（8）计算：

$$\text{样品的硝酸根含量（mg/kg）} = 1.35 \times \left[\frac{100000 \times c_2}{m \times V_2} - W\left(NO_2^-\right) \right] \times \frac{100}{r} \cdots\cdots (8)$$

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按式（9）计算：

$$W（NaNO_3）= 1.371 \times W(NO_3^-) \cdots\cdots (9)$$

式中：

$W（NO_3^-）$——样品中硝酸根的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

$W（NaNO_3）$——样品中以硝酸钠计的硝酸盐的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

19 精密度

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 mg/kg。

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 mg/kg 时，不应超过 3 mg/kg；在硝酸盐含量大于 30 mg/kg 时，不应超过结果平均值的 10%。

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 mg/kg 时，差值不应超过 8 mg/kg；在硝酸盐含量大于或等于 30 mg/kg 时，该差值不应超过结果平均值的 25 %。

20 其他

本标准第一法中亚硝酸盐和硝酸盐检出限分别为 0.2 mg/kg 和 0.4 mg/kg；第二法中亚硝酸盐和硝酸盐检出限分别为 1 mg/kg 和 1.4 mg/kg；第三法中亚硝酸盐和硝酸盐检出限分别为 0.2 mg/kg 和 1.5 mg/kg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5009.93—2010

食品安全国家标准
食品中硒的测定

National food safety standard

Determination of selenium in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5009.93-2003《食品中硒的测定》。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5009.93-2003；

——GB/T 12399-1996；

——GB 13105-1991。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

食品中硒的测定

1 范围

本标准规定了用氢化物原子荧光光谱法和荧光法测定食品中硒的方法。

本标准适用于食品中硒的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 氢化物原子荧光光谱法

3 原理

试样经酸加热消化后，在 6 mo1/L 盐酸介质中，将试样中的六价硒还原成四价硒，用硼氢化钠或硼氢化钾作还原剂，将四价硒在盐酸介质中还原成硒化氢（H_2Se），由载气（氩气）带入原子化器中进行原子化，在硒空心阴极灯照射下，基态硒原子被激发至高能态，在去活化回到基态时，发射出特征波长的荧光，其荧光强度与硒含量成正比。与标准系列比较定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所使用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 硝酸：优级纯。

4.2 高氯酸：优级纯。

4.3 盐酸：优级纯。

4.4 混合酸：将硝酸与高氯酸按 9：1 体积混合。

4.5 氢氧化钠：优级纯。

4.6 硼氢化钠溶液（8 g/L）：称取 8.0 g 硼氢化钠（$NaBH_4$），溶于氢氧化钠溶液（5 g/L）中，然后定容至 1000 mL，混匀。

4.7 铁氰化钾（100 g/L）：称取 10.0 g 铁氰化钾[（$K_3Fe(CN)_6$）]，溶于 100 mL 水中，混匀。

4.8 硒标准储备液：精确称取 100.0 mg 硒（光谱纯），溶于少量硝酸中，加 2 mL 高氯酸，置沸水浴中加热 3 h～4 h，冷却后再加 8.4 mL 盐酸，再置沸水浴中煮 2 min，准确稀释至 1000 mL，其盐酸浓度为 0.1 mo1/L，此储备液浓度为每毫升相当于 100 μg 硒。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.9 硒标准应用液：取 100μg/mL 硒标准储备液 1.0 mL，定容至 100 mL，此应用液浓度为 1μg /mL。

注：也可购买该元素有证国家标准溶液。

4.10 盐酸（6 mol/L）：量取 50 mL 盐酸（4.3）缓慢加入 40 mL 水中，冷却后定容至 100 mL。

4.11 过氧化氢（30 %）。

5 仪器和设备

5.1 原子荧光光谱仪，带硒空心阴极灯。

5.2 电热板。

5.3 微波消解系统。

5.4 天平：感量为 1 mg。

5.5 粉碎机。

5.6 烘箱。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 粮食：试样用水洗三次，于 60 ℃烘干，粉碎，储于塑料瓶内，备用。

6.1.2 蔬菜及其他植物性食物：取可食部用水洗净后用纱布吸去水滴，打成匀浆后备用。

6.1.3 其它固体试样：粉碎，混匀，备用。

6.1.4 液体试样：混匀，备用。

6.1.5 试样消解

6.1.5.1 电热板加热消解：称取 0.5 g～2 g（精确至 0.001g）试样，液体试样吸取 1.00mL～10.00 mL，置于消化瓶中，加 10.0 mL 混合酸及几粒玻璃珠，盖上表面皿冷消化过夜。次日于电热板上加热，并及时补加硝酸。当溶液变为清亮无色并伴有白烟时，再继续加热至剩余体积 2 mL 左右，切不可蒸干。冷却，再加 5.0 mL 盐酸（4.10），继续加热至溶液变为清亮无色并伴有白烟出现，将六价硒还原成四价硒。冷却，转移至 50 mL 容量瓶中定容，混匀备用。同时做空白试验。

6.1.5.2 微波消解：称取 0.5 g～2 g（精确至 0.001g） 试样于消化管中，加 10 mL 硝酸、2 mL 过氧化氢，振摇混合均匀，于微波消化仪中消化，其消化推荐条件见表 1（可根据不同的仪器自行设定消解条件）：

表1 微波消化推荐条件

STAGE	POWER		RAMP	℃	HOLD
1	1600 W	100%	6:00	120 ℃	1:00
2	1600 W	100%	3:00	150 ℃	5:00
3	1600 W	100%	5:00	200 ℃	10:00

冷却后转入三角瓶中，加几粒玻璃珠，在电热板上继续加热至近干，切不可蒸干。再加 5.0 mL 盐酸（4.10），继续加热至溶液变为清亮无色并伴有白烟出现，将六价硒还原成四价硒。冷却，转移试样

食品伙伴网http://www.foodmate.net

消化液于 25 mL 容量瓶中定容，混匀备用。同时做空白试验。

吸取 10.0 mL 试样消化液于 15 mL 离心管中，加盐酸（4.3）2.0 mL，铁氰化钾溶液（4.7）1.0 mL，混匀待测。

6.2 标准曲线的配制

分别取 0.00 mL，0.10 mL，0.20 mL，0.30 mL，0.40 mL，0.50 mL 标准应用液于 15 mL 离心管中用去离子水定容至 10 mL，再分别加盐酸（4.3）2 mL，铁氰化钾溶液（4.7）1.0 mL，混匀，制成标准工作曲线。

6.3 测定

6.3.1 仪器参考条件：负高压：340 V；灯电流：100 mA；原子化温度：800 ℃；炉高：8 mm；载气流速：500 mL/min；屏蔽气流速：1000 mL/min；测量方式：标准曲线法；读数方式：峰面积；延迟时间：1 s；读数时间：15 s；加液时间：8 s；进样体积：2 mL。

6.3.2 测定： 设定好仪器最佳条件，逐步将炉温升至所需温度后，稳定 10 min～20 min 后开始测量。连续用标准系列的零管进样，待读数稳定之后，转入标准系列测量，绘制标准曲线。转入试样测量，分别测定试样空白和试样消化液，每测不同的试样前都应清洗进样器。试样测定结果按 7 计算。

7 分析结果的表述

按式（1）计算试样中硒的含量：

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \quad \text{.....（1）}$$

式中：

X ——试样中硒的含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）；

C ——试样消化液测定浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C_0 ——试样空白消化液测定浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

m ——试样质量（体积），单位为克或毫升（g 或 mL）；

V ——试样消化液总体积，单位为毫升（mL）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第二法 荧光法

9 原理

将试样用混合酸消化，使硒化合物氧化为无机硒 Se^{4+}，在酸性条件下 Se^{4+}与 2,3–二氨基萘（2,3–Diaminonaphthalene，缩写为 DAN）反应生成 4,5–苯并苤硒脑（4,5–Benzo piaselenol），然后用环己烷萃取。在激发光波长为 376 nm，发射光波长为 520 nm 条件下测定荧光强度，从而计算出试样中硒的含量。

10 试剂和材料

食品伙伴网http://www.foodmate.net

除非另有规定，本方法所使用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

10.1 硒标准溶液：准确称取元素硒（光谱纯）100.0 mg，溶于少量浓硝酸中，加入 2 mL 高氯酸（70 %~72 %），至沸水浴中加热 3 h～4 h，冷却后加入 8.4 mL HCl（盐酸浓度为 0.1 mol/L）。再置沸水浴中煮 2min。准确稀释至 1000 mL，此为储备液（Se 含量：100 μg/mL）。使用时用 0.1 mol/L 盐酸将储备液稀释至每毫升含 0.05 μg 硒。于冰箱内保存，两年内有效。

10.2 DAN 试剂（1.0g/L）：此试剂在暗室内配制。称取 DAN（纯度 95%～98%）200 mg 于一带盖锥形瓶中，加入 0.1 mol/L 盐酸 200 mL，振摇约 15 min 使其全部溶解。加入约 40 mL 环己烷，继续振荡 5 min。将此液倒入塞有玻璃棉（或脱脂棉）的分液漏斗中，待分层后滤去环己烷层，收集 DAN 溶液层，反复用环己烷纯化直至环己烷中荧光降至最低时为止（约纯化 5~6 次）。将纯化后的 DAN 溶液储于棕色瓶中，加入约 1 cm 厚的环己烷覆盖表层，至冰箱内保存。必要时在使用前再以环己烷纯化一次。

警告：此试剂有一定毒性，使用本试剂的人员应有正规实验室工作经验。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关规定的条例。

10.3 混合酸：将硝酸及高氯酸按 9+1 体积混合。

10.4 去硒硫酸：取浓硫酸 200 mL 缓慢倒入 200 mL 水中，再加入 48 %氢溴酸 30 mL，混匀，至沙浴上加热至出现白浓烟，此时体积应为 200 mL。

10.5 EDTA 混合液

10.5.1 EDTA 溶液（0.2 mol/L）：称取 EDTA 二钠盐 37 g，加水并加热至完全溶解，冷却后稀释至 500 mL；

10.5.2 盐酸羟胺溶液（100 g/L）：称取 10 g 盐酸羟胺溶于水中，稀释至 100 mL；

10.5.3 甲酚红指示剂（0.2 g/L）：称取甲酚红 50 mg 溶于少量水中，加氨水（1+1）1 滴，待完全溶解后加水稀释至 250 mL。

10.5.4 取 EDTA 溶液（10.5.1）及盐酸羟胺溶液（10.5.2）各 50 mL，加甲酚红指示剂（10.5.3）5 mL，用水稀释至 1 L，混匀。

10.6 氨水（1+1）。

10.7 盐酸。

10.8 环己烷：需先测试有无荧光杂质，否则重蒸后使用，用过的环己烷可回收，重蒸后再使用。

10.9 盐酸（1+9）。

11 仪器和设备

11.1 荧光分光光度计。

11.2 天平：感量为 1mg。

11.3 烘箱。

11.4 粉碎机。

11.5 电热板。

11.6 水浴锅。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

12 分析步骤

12.1 试样处理

12.1.1 粮食

试样用水洗三次，至 60 ℃烤箱中烘去表面水分，用粉碎机粉碎，储于塑料瓶内，放一小包樟脑精，盖紧瓶塞保存，备用。

12.1.2 蔬菜及其他植物性食物

取可食部，用蒸馏水冲洗三次后，用纱布吸去水滴，不锈钢刀切碎，取一定量试样在烘箱中于 60 ℃烤干，称重，计算水分。粉碎，备用。

计算时应折合成鲜样重。

12.1.3 其它固体试样

粉碎、混匀试样，备用。

12.1.4 液体试样

混匀试样，备用。

12.2 试样的消化

称含硒量约为 0.01 μg～0.5 μg 的粮食或蔬菜及动物性试样 0.5 g～2 g（精确至 0.001g），液体试样吸取 1.00mL～10.00 mL 于磨口锥形瓶内，加 10 mL 5 %去硒硫酸，待试样湿润后，再加 20 mL 混合酸液放置过夜，次日置电热板上逐渐加热。当剧烈反应发生后，溶液呈无色，继续加热至白烟产生，此时溶液逐渐变成淡黄色，即达终点。某些蔬菜试样消化后出现浑浊，以致难以确定终点，这时可注意瓶内出现滚滚白烟，此刻立即取下，溶液冷却后又变为无色。有些含硒较高的蔬菜含有较多的 Se^{6+}，需要在消化完成后再加 10 mL 10%盐酸，继续加热，使再回终点，以完全还原 Se^{6+}为 Se^{4+}，否则结果将偏低。

12.3 测定

上述消化后的试样溶液加入 20.0 mL EDTA 混合液，用氨水（10.6）及盐酸（10.9）调至淡红橙色（pH 1.5～2.0）。以下步骤在暗室操作：加 DAN 试剂（10.2）3.0 mL，混匀后，置沸水浴中加热 5 min，取出冷却后，加环己烷 3.0 mL，振摇 4 min，将全部溶液移入分液漏斗，待分层后弃去水层，小心将环己烷层由分液漏斗上口倾入带盖试管中，勿使环己烷中混入水滴，于荧光分光光度计上用激发光波长 376 nm、发射光波长 520 nm 测定 4,5–苯并苤硒脑的荧光强度。

12.4 硒标准曲线绘制

准确量取标准硒溶液（0.05 μg/mL）0.00 mL，0.20 mL，1.00 mL，2.00 mL 及 4.00 mL，相当于 0.00 μg，0.01 μg，0.05 μg，0.10 μg 及 0.20 μg 硒，加水至 5.0 mL 后，按试样测定步骤同时进行测定。

当硒含量在 0.5 μg 以下时荧光强度与硒含量呈线性关系，在常规测定试样时，每次只需做试剂空白与试样硒含量相近的标准管（双份）即可。

12.5 分析结果的表述

试样中硒含量按式（2）计算：

$$X = \frac{m_1}{F_1 - F_0} \times \frac{F_2 - F_0}{m} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中硒含量，单位为微克每克或微克每毫升(μg /g 或μg /mL)；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

m_1——试管中硒的质量，单位为微克（μg）；
F_1——标准硒荧光读数；
F_2——试样荧光读数；
F_0——空白管荧光读数；
m——试样质量，单位为克或毫升（g 或 mL）。
以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

13 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.10—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 K_1 的测定

National food safety standard

Determination of vitamin K_1 in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准等同采用国际分析家学会（AOAC）AOAC 999.15 Vitamin K in Milk and Infant Formulas Liquid Chromatographic Method。

本标准代替GB/T 5413.10-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素K_1的测定》。

本标准与GB/T 5413.10-1997相比，主要变化如下：

——标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素K_1的测定》；

——试样处理改为试样经酶水解后，用NaOH皂化，用正己烷萃取；

——测定改为用高效液相色谱柱后还原荧光法定量测定维生素 K_1；

——仪器中将“高压液相色谱仪带紫外检测器”修改为“高效液相色谱仪，带荧光检测器”。

本标准附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.10-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素 K_1 的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 K_1 的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 K_1 的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

用脂肪酶降解试样中的脂肪和不饱和脂肪酸，对于含淀粉试样需先用淀粉酶降解试样中的淀粉，经碱皂化后，用正己烷提取维生素 K_1。通过液相色谱法分离，柱后还原维生素 K_1，荧光检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 氢氧化钠溶液（10 mol/L）：临用前配制。

4.2 95 %乙醇。

4.3 饱和氯化钠溶液。

4.4 正己烷：色谱纯。

4.5 无水硫酸钠。

4.6 甲醇：色谱纯。

4.7 二氯甲烷：色谱纯。

4.8 冰醋酸。

4.9 氯化锌。

4.10 无水乙酸钠。

4.11 流动相：甲醇（4.6）900 mL，二氯甲烷（4.7）100 mL，冰醋酸（4.8）0.3 mL，氯化锌（4.9）1.5 g，无水乙酸钠（4.10）0.5 g，溶解后用 0.45 μm 滤膜过滤。

4.12 淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.13　脂肪酶：酶活力≥700 U/mg。

4.14　锌粉：粒度 50 μm～70 μm。

4.15　维生素 K_1 标准溶液：标准溶液浓度校正方法参见附录 A。

4.15.1　维生素 K_1 标准储备液（2 mg/mL）：称取 0.05 g 维生素 K_1 标准品（精确到 0.1 mg），于 25 mL 容量瓶中，用正己烷溶解定容。

4.15.2　维生素 K_1 标准中间液（20 μg/mL）：取标准储备液（4.15.1）1 mL 加正己烷定容至 100 mL。

5　仪器和设备

5.1　高效液相色谱仪，带有荧光检测器。

5.2　天平：感量为 0.1 mg。

5.3　分液漏斗：250 mL。

5.4　旋转蒸发器。

5.5　恒温空气浴振荡器。

5.6　离心机：转速≥3000 转/分钟。

5.7　氮吹仪。

6　分析步骤

6.1　试样处理

6.1.1　含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约 2.5 g 或液体试样约 10 g（精确到 0.1 mg）于三角瓶中，加入 0.5 g 淀粉酶（4.12），用 30 mL 温水溶解。

6.1.2　不含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约2.5 g或液体试样约10 g（精确到0.1 mg）于三角瓶中，用30 mL温水溶解。

6.2　测定液的制备

向上述处理过的试样溶液中加入 1 g 脂肪酶（4.13），于 37 ℃ ±5 ℃恒温空气浴振荡器中振荡过夜，使其充分酶解。取出酶解好的试样，加入 2 mL 氢氧化钠溶液（4.1），用 50 mL 乙醇（4.2）将溶液转入 250 mL 的分液漏斗中，充分混匀（必要时加少量饱和氯化钠溶液（4.3））。加入 50 mL 正己烷（4.4）。充分振摇 2 min，静置分层。放出下层水相于另一个 250 mL 分液漏斗中，留下有机相。 向水相中再次加入 50 mL 正己烷再次萃取。合并有机相。用适量蒸馏水洗有机相两次。将有机相通过无水硫酸钠（4.5）脱水过滤到一个 500 mL 的烧瓶中，在旋转蒸发器上于 40 ℃ ±2 ℃下蒸发至近干。用正己烷（4.4）转移残留物到一个 10 mL 试管中，置氮吹仪上于 40 ℃ ±2 ℃下吹干，准确加入 1 mL 正己烷（4.4），充分振荡溶解残留物。将试管放入冰箱中在 0 ℃以下冷冻 1 h 备用。

6.3　测定

6.3.1　色谱参考条件

食品伙伴网http://www.foodmate.net

色谱柱：C_{18}色谱柱，150 mm ×4.6 mm，5 μm，或具同等性能的色谱柱；

锌还原柱： 4.6 mm ×50 mm（参见附录 B）；

检测波长： 激发波长为 243 nm，发射波长为 430 nm；

流动相：甲醇（4.6）900 mL，二氯甲烷（4.7）100 mL，冰醋酸（4.8）0.3 mL，氯化锌（4.9）1.5 g，无水乙酸钠（4.10）0.5 g，溶解后用 0.45 μm 滤膜过滤；

流速：1 mL/min；

进样量：10 μL。

6.3.2 维生素 K_1 标准曲线绘制

分别准确吸取标准中间液（4.15.2）0.0 mL，0.5 mL，1.0 mL，1.5 mL，2.0 mL，2.5 mL加正己烷定容至25 mL，此标准系列工作液维生素K_1浓度分别为0.00 μg/mL，0.40 μg/mL，0.80 μg/mL，1.20 μg/mL，1.60 μg/mL，2.00 μg/mL。

将系列标准维生素K_1工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高，以峰面积或峰高为纵坐标，以标准测定液浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.3.3 测定液的测定

将制备好的测定液（6.2）在暗处放至室温，于离心机中在 3000 转/分钟下离心 5 min，吸取上清液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高（标准色谱图参见附录 C）。从标准曲线上查得试样溶液中维生素 K_1 的浓度或通过回归方程计算出试样溶液中维生素 K_1 的浓度（μg/mL）。

7 分析结果的表述

试样中维生素 K_1 的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C_i \times V_i \times n}{m_i} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——维生素 K_1 的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_i——试样溶液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V_i——试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m_i——试样的质量，单位为克（g）；

n——样液稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留到小数点后一位。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

9.1 由于维生素 K_1 遇光易分解，整个操作应避光。

9.2 本标准检出限为 1 μg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
标准溶液浓度校正方法

标准溶液配制后需要对所配制的标准溶液进行校正，具体操作如下：

维生素K_1标准浓度的标定：取维生素K_1标准工作溶液，按给定波长测定各维生素的吸光值，用比吸光系数计算出该维生素K_1的浓度。测定条件见表A.1。

表A.1 维生素K_1吸光值的测定条件

标准	比吸光系数 $E_{cm}^{1\%}$	波长 λ（nm）
维生素K_1	422	248

浓度按式(2)计算：

$$C_1=\frac{A}{E}\times\frac{1}{100} \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

C_1——维生素K_1浓度，单位为克每毫升（g/mL）；

A——维生素K_1的平均紫外吸光值；

E——维生素K_1 1 %比色光系数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（资料性附录）
锌还原柱填装方法

将锌粉（4.14）密集装入还原柱（4.6 mm ×50 mm，不锈钢材质）中。装柱时，应连续少量多次将锌粉装入柱中，边装边轻轻拍打，以使装入的锌粉紧密。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 C
（资料性附录）
维生素 K_1 液相色谱图

C.1 维生素 K_1 液相色谱图

维生素 K_1 液相色谱图见图 C.1。

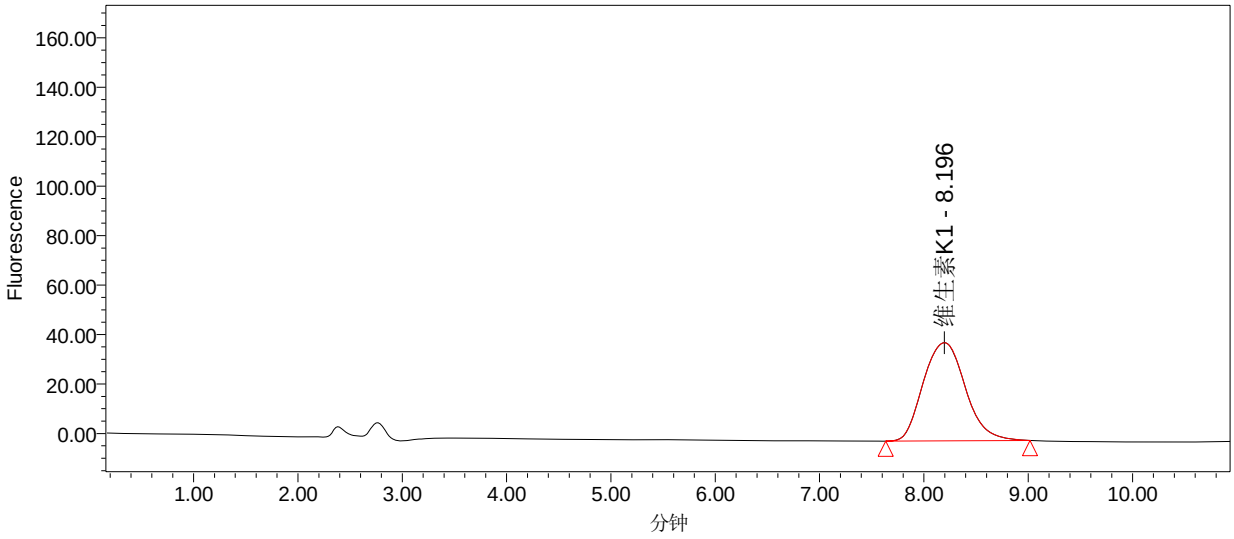


图 C.1 维生素 K_1 液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.11—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 B_1 的测定

National food safety standard

Determination of vitamin B_1 in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.11-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素B_1的测定》。

本标准与GB/T 5413.11-1997相比，主要变化如下：

——标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B_1的测定》；

——取消了原标准第一法（荧光分光光度法）；

——对原标准的结构进行了修改；

——外标法定量采用多点标准曲线法；

——在结果计算时明确样品中维生素B_1含量以硫胺素计；

——增加附录A标样的液相色谱图。

本标准附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.11-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素 B_1 的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B_1 的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 B_1 的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

样品在稀盐酸环境中恒温水解，酶解，样液用碱性铁氰化钾衍生，正丁醇（或异丁醇）萃取后，经 C_{18} 反相色谱柱分离，用荧光检测器（Ex：375 nm，Em：435 nm）检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 正丁醇或异丁醇。

4.2 铁氰化钾。

4.3 氢氧化钠。

4.4 浓盐酸。

4.5 三水乙酸钠。

4.6 冰乙酸。

4.7 甲醇：色谱纯。

4.8 维生素 B_1 标准品：硫胺素盐酸盐或硫胺素硝酸盐，纯度≥99 %。

4.9 铁氰化钾溶液（20 g/L）：称取 2 g 铁氰化钾（4.2），用水溶解并定容至 100 mL。临用前配制。

4.10 氢氧化钠溶液（100 g/L）：称取 25 g 氢氧化钠（4.3），用水溶解并定容至 250 mL。

4.11 碱性铁氰化钾溶液：将 5 mL 铁氰化钾溶液（4.9）与 200 mL 氢氧化钠溶液（4.10）混合。临用前配制。

4.12 盐酸（0.1 mol/L）：吸取 9 mL 浓盐酸（4.4），溶于 1000 mL 水中。

4.13 盐酸（0.01 mol/L）：吸取 0.1 mol/L 盐酸（4.12）50 mL，用水稀释并定容至 500 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.14 乙酸钠溶液（0.05 mol/L）：称取 6.80 g 三水乙酸钠（4.5），加 900 mL 水溶解，用冰乙酸（4.6）调 pH 值至 4.0～5.0，定容至 1000 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

4.15 乙酸钠溶液（2.0 mol/L）：称取 27.22 g 三水乙酸钠（4.5），用水溶解并定容至 100 mL。

4.16 混合酶溶液，称取 2.345 g 木瓜蛋白酶（活力单位≥600 U/g）、1.175 g 淀粉酶（活力单位≥4000 U/g），用水溶解并定容至 50 mL。临用前配制。

4.17 标准溶液

4.17.1 维生素 B_1 标准储备液（500 μg/mL）：称取相当于硫胺素 50 mg（精确至 0.1 mg）的维生素 B_1 标准品（4.8），用 0.01 mol/L 盐酸（4.13）溶解并定容于 100 mL。置于 0 ℃～4 ℃冰箱中，保存期为 3 个月。

4.17.2 维生素 B_1 标准中间液：准确吸取 2.00 mL 标准储备液（4.17.1），用水稀释并定容至 100 mL，此溶液中维生素 B_1 浓度为 10 μg/mL。临用前配制。

4.17.3 维生素 B_1 标准工作液：分别吸取维生素 B_1 标准中间液（4.17.2）0 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL，用水溶解并定容至 100 mL。该标准系列浓度分别为 0 μg/mL、0.05 μg/mL、0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.5 μg/mL、1.00 μg/mL。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带有荧光检测器。

5.2 高压灭菌锅。

5.3 离心机：转速≥4000 转/分钟。

5.4 pH 计：精度 0.01。

5.5 组织捣碎机（转速在 0 转/分钟～12000 转/分钟可调）。

5.6 0.45 μm 微孔有机滤膜。

5.7 天平：感量为 0.001g 和 0.0001g。

6 分析步骤

6.1 试样的处理

6.1.1 试液提取

称取5 g～10 g（精确至0.01 g）试样（如有必要，将试样放入捣碎机中捣碎；试样中含维生素B_1 5 μg以上）于100 mL三角瓶中，加60 mL 0.1 mol/L盐酸（4.12），充分摇匀，用棉花塞和牛皮纸封口，放入高压灭菌锅内，在121 ℃下保持30 min，待冷却至40 ℃以下后取出，轻摇数次；用2.0 mol/L 乙酸钠溶液（4.15）调 pH 值至4.0 左右，加入2.0 mL（可根据酶活力不同适当调整用量）混合酶液（4.16），摇匀后，置于37 ℃的培养箱中过夜；将酶解液转移至100 mL容量瓶中，用水定容至刻度，滤纸过滤，取滤液备用。

6.1.2 试液衍生化

取上述滤液 10.00 mL 于 25 mL 具塞比色管中，加入 5 mL 碱性铁氰化钾（4.11），充分混匀后，加 10.00 mL 正丁醇（或异丁醇）（4.1），强烈振荡后静置约 10 min，充分分层，吸取正丁醇（或异丁醇）相（上层）于 4000 转/分钟～6000 转/分钟离心 5 min，取上清液经有机微孔滤膜过滤（5.6），供进样用。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

另取 10.00 mL 标准工作液（4.17.3），与试液同步进行衍生化。

注 1：室温条件下衍生产物在 4 h 内稳定。

注 2：6.1.1 和 6.1.2 操作过程应在避免强光照射的环境下进行。

6.2 测定

6.2.1 色谱参考条件

色谱柱：C_{18} 反相色谱柱（粒径 5 μm，250 mm ×4.6 mm）或相当者。

流动相：0.05 mol/L 乙酸钠溶液（4.14）—甲醇（4.7）= 65+35。

流速：1.00 mL/min。

检测波长：激发波长 375 nm，发射波长 435 nm。

进样量：20 μL。

6.2.2 标准曲线绘制

将维生素 B_1 标准系列工作液（4.17.3）衍生物依次按上述推荐色谱条件上机测定，记录色谱峰面积，色谱图参见附录 A。以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.2.3 试液测定

将试液衍生物按上述推荐色谱条件进样测定，从标准曲线中查得试液相应的浓度。

7 分析结果的表述

试样中维生素B_1的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X ——试样中维生素 B_1 的含量（以硫胺素计），单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c ——试液的进样浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

当取样量为10.00 g时，本标准中方法定量限为0.05 mg/100g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
维生素 B_1 标准溶液的液相色谱图

A.1 维生素 B_1 标准溶液的液相色谱图

维生素 B_1 标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

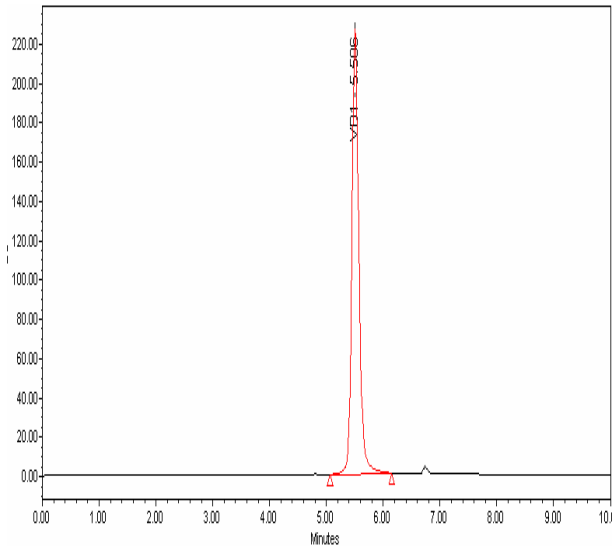


图 A.1 维生素 B_1 标准溶液的液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.12—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 B_2 的测定

National food safety standard

Determination of vitamin B_2 in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.12-1997《婴幼儿食品和乳粉 维生素B_2的测定》。

本标准与GB/T 5413.12-1997相比，主要变化如下：

——标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B_2的测定》。

——取消了方法一荧光分光光度法；

——对原标准的结构进行了修改；

——混合酶液中增加了酸性磷酸酶，以解决添加核黄素磷酸盐作为维生素B_2强化剂的样品测定；

——样品处理方法中增加了“避免强光照射”的注意点；

——外标法定量采用多点标准曲线法；

——在结果计算时明确样品中维生素B_2含量以核黄素计；

——增加附录A标准溶液的液相色谱图。

本标准附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.12-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素B_2的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B_2 的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 B_2 的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样在稀盐酸环境中恒温水解，酶解，经 C_{18} 反相色谱柱分离，用荧光检测器（Ex：462 nm，Em：522 nm）检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 盐酸。

4.2 三水乙酸钠。

4.3 冰乙酸。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 维生素 B_2（核黄素）标准品：纯度≥99%。

4.6 盐酸（1+1）：量取 100 mL 盐酸（4.1）缓慢倒入 100 mL 水中，混匀。

4.7 盐酸（0.1 mol/L）：吸取 9 mL 盐酸（4.1），溶于 1000 mL 水中。

4.8 盐酸（0.01 mol/L）：吸取 0.1 mol/L 盐酸（4.7）50 mL，用水稀释并定容至 500 mL。

4.9 乙酸钠溶液（0.05 mol/L）：称取 6.80 g 三水乙酸钠（4.2），加 900 mL 水溶解，用冰乙酸调 pH 值至 4.0～5.0，用水定容至 1000 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

4.10 乙酸钠溶液（2.0 mol/L）：称取 27.22 g 三水乙酸钠（4.2），用水溶解并定容至 100 mL。

4.11 混合酶溶液：称取 2.345 g 木瓜蛋白酶（活力单位≥600 U/g）、1.175 g 淀粉酶（活力单位≥4000 U/g）和 1.000 g 酸性磷酸酶（活力单位≥4000 U/g），用水定容至 50 mL。临用前配制。

4.12 标准溶液

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.12.1 维生素 B_2 标准储备液（250 μg/mL）：称取 25mg （精确至 0.1 mg）维生素 B_2 标准品（4.5），加入盐酸（4.6）2 mL，超声溶解后，立即用水转移并定容至 100 mL。置于棕色玻璃容器中在 0℃～4℃冰箱贮存，保存期为 3 个月。

4.12.2 维生素 B_2 标准中间液：准确吸取 4.00 mL 标准储备液（4.12.1），用水稀释并定容至 100 mL，此溶液中维生素 B_2 浓度为 10 μg/mL。临用前配制。

4.12.3 维生素 B_2 标准系列工作液：分别吸取维生素 B_2 标准中间液（4.12.2）0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL，用水溶解并定容至 100 mL。该标准系列浓度分别为 0.00 μg/mL、0.05 μg/mL、0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.50 μg/mL、1.00 μg/mL。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带有荧光检测器。

5.2 高压灭菌锅。

5.3 pH 计：精度为 0.01。

5.4 组织捣碎机。

5.5 0.45 μm 微孔水相滤膜。

5.6 天平：感量 1 mg 和 0.1 mg。

6 分析步骤

6.1 试样的处理

称取5 g～10 g（精确至0.01 g）试样（如有必要，将试样放入捣碎机中捣碎；试样中含维生素B_2 5 μg以上）于100 mL三角瓶中，加60 mL 0.1 mol/L盐酸（4.7），充分摇匀，用棉花塞和牛皮纸封口，放入高压灭菌锅内，在121 ℃下保持30 min，待冷却至40 ℃以下后取出，轻摇数次；用2.0 mol/L乙酸钠溶液（4.10）调pH值至4.0左右，加入2.0 mL混合酶溶液（4.11），摇匀后，置于37℃培养箱中过夜；将酶解液转移至100 mL容量瓶中，用水定容至刻度，用定量滤纸过滤，取滤液再经0.45 μm滤膜（5.5）过滤，取滤液备用。

注：操作过程应避免强光照射。

6.2 测定

6.2.1 参考色谱条件

色谱柱：C_{18} 反相色谱柱（粒径 5 μm，250 mm ×4.6 mm）或同等性能的色谱柱。

流动相：0.05 mol/L 乙酸钠溶液（4.9）—甲醇（4.4）= 65＋35。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：激发波长 462 nm，发射波长 522 nm。

进样量：20 μL。

6.2.2 标准曲线绘制

将维生素 B_2 标准系列工作液（4.12.3）依次进行色谱测定（其标准样品色谱图参见附录 A 中图A.1），记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.2.3 试液测定

将试液进行色谱测定，从标准曲线中查得试液相应的浓度。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.2.4 空白试验

除不加试样外，按上述操作步骤进行。

7 分析结果的表述

试样中维生素B_2的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中维生素 B_2 的含量（以核黄素计），单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c——试液的进样浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

9 其他

本标准定量限为：当取样量为 10.00 g 时，0.05 mg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
维生素 B_2 标准溶液的液相色谱图

A.1 维生素 B_2 标准溶液的液相色谱图

维生素 B_2 标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

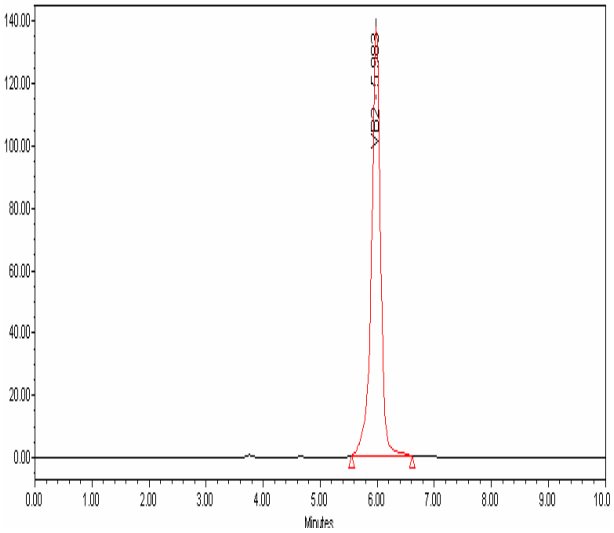


图 A.1 维生素 B_2 标准溶液的液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.13—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 B_6 的测定

National food safety standard

Determination of vitamin B_6 in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.13-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素B_6的测定》。

本标准与GB/T 5413.13-1997相比，主要变化如下：

——标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B_6的测定》；

——完善了维生素B_6含量的计算。

本标准附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.13-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 B_6 的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B_6 的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 B_6 的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样经热水提取等前处理后，经 C_{18} 色谱柱分离，荧光检测器检测，外标法定量测定维生素 B_6（吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）的含量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 辛烷磺酸钠：优级纯。

4.3 冰乙酸：优级纯。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 三乙胺：色谱纯。

4.6 盐酸溶液（5.0 mol/L，0.1 mol/L）。

4.7 氢氧化钠溶液（5.0 mol/L，0.1 mol/L）。

4.8 标准溶液

4.8.1 维生素 B_6（吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）标准贮备液（1 mg/mL）：称取 0.05 g（精确至 0.0001 g）吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准品，分别置于 50 mL 容量瓶中，用水溶解定容。

4.8.2 维生素 B_6（吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）混合标准中间液（20 μg/mL）：分别准确吸取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准贮备液（4.8.1）1 mL 至 50 mL 容量瓶中，用水定容。

4.8.3 维生素 B_6（吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）混合标准系列测定液：分别准确吸取维生素 B_6 混合标准中间液（4.8.2）0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、5.0 mL，至 100 mL 容量瓶中，用水定容。该标准系列浓度分别为 0.00 μg/mL、0.20 μg/mL、0.40 μg/mL、0.60 μg/mL、1.00 μg/mL。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 超声波振荡器。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.2 高效液相色谱仪，带荧光检测器。

5.3 天平：感量为 0.1 mg。

5.4 pH 计：精度为 0.01。

5.5 培养箱：30 ℃～80 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样预处理

6.1.1 含淀粉的试样：称取混合均匀固体试样约 5.0 g（精确至 0.0001 g），加入约 25 mL 45 ℃～50 ℃的水，或称取混合均匀液体试样约 20.0 g（精确至 0.0001 g）于 150 mL 锥形瓶中。加入约 0.5 g 淀粉酶（4.1），混匀后向锥形瓶中充氮，盖上瓶塞，置 50 ℃～60 ℃培养箱内约 30 min。取出冷却至室温。

6.1.2 不含淀粉的试样：称取混合均匀固体试样约 5.0 g（精确至 0.0001 g），加入约 25 mL 45 ℃～50 ℃的水，或称取混合均匀液体试样约 20.0 g（精确至 0.0001 g）于 150 mL 锥形瓶中。混匀并充分溶解，静置 5 min～10 min，冷却至室温。

6.2 待测液的制备

6.2.1 用盐酸溶液（4.6）调节试样溶液的 pH 值至 1.7 ± 0.1，放置约 1 min。再用氢氧化钠溶液（4.7）调节试样溶液的 pH 值至 4.5 ± 0.1。

6.2.2 将试样溶液转移至 50 mL 容量瓶中，用水冲洗锥形瓶。洗液合并于 50 mL 容量瓶中，用水定容至 50 mL。

6.2.3 把上述容量瓶放入超声波振荡器中，超声振荡约 10 min。

6.2.4 另取 50 mL 三角瓶，上面放入三角漏斗和滤纸，把超声波振荡的试样溶液倒入其中，自然过滤。滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜加压过滤，用试管收集，即为试样待测液。

6.3 参考色谱条件

色谱柱：C_{18}柱 （粒径5 μm，150 mm ×4.6 mm）或同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.4）50 mL，辛烷磺酸钠（4.2）2.0 g，三乙胺（4.5）2.5 mL，用水溶解并定容到1000 mL后，用冰乙酸（4.3）调pH至3.0 ± 0.1，再经0.45 μm微孔滤膜加压过滤。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：激发波长 293 nm，发射波长 395 nm。

进样量：10 μL。

6.4 定量分析

6.4.1 标准曲线绘制

将维生素 B_6 混合标准系列测定液（4.8.3）依次进行色谱测定（其标准样品色谱图参见附录 A 中图 A.1）。记录各组分的色谱峰面积或峰高，以峰面积或峰高为纵坐标，以标准测定液的浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.4.2 试样测定

将试样待测液（6.2.4）进行色谱测定。记录各组分色谱峰面积或峰高，根据标准曲线计算出试样待测液中维生素 B_6 各组分的浓度 c_i。

7 分析结果的表述

7.1 试样中维生素B_6各组分的含量的计算

试样中维生素B_6各组分的含量按式（1）计算：

食品伙伴网http://www.foodmate.net

$$X_i = \frac{c_i \times V \times 100}{m} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_i——试样中组分的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

c_i——试样待测液中维生素B_6各组分的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

V——试样溶液的体积，单位为毫升（mL）。

7.2 试样中维生素B_6的含量的计算

试样中维生素B_6的含量按式（2）计算：

$$X = X_{醇} + X_{醛} \times 1.012 + X_{胺} \times 1.006 \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中维生素B_6含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

$X_{醇}$——试样中吡哆醇含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

$X_{醛}$——试样中吡哆醛含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

$X_{胺}$——试样中吡哆胺含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

1.012——吡哆醛的含量换算成吡哆醇的系数；

1.006——吡哆胺的含量换算成吡哆醇的系数。

注：试样中维生素B_6含量以吡哆醇计。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

本标准检出限为：吡哆醇 1.5 μg/100 g、吡哆醛 1.3 μg/100 g、吡哆胺 1.6 μg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
维生素 B_6 标准溶液的液相色谱图

A.1 维生素 B_6 标准溶液的液相色谱图

维生素 B_6 标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

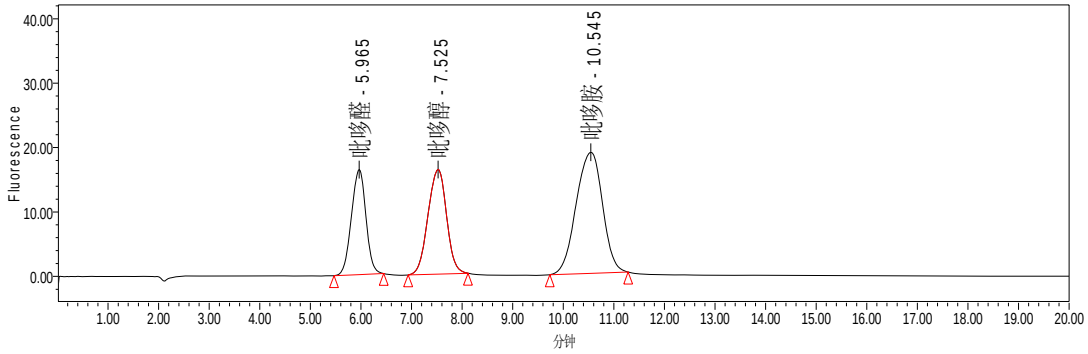


图 A.1 维生素 B_6 标准溶液的液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.14—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 B_{12} 的测定

National food safety standard

Determination of vitamin B_{12} in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.14-1997《婴幼儿食品和乳粉 维生素B_{12}的测定》。

本标准与GB/T 5413.14-1997相比，主要变化如下：

——标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B_{12}的测定》。

本标准附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.14-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素 B_{12} 的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B_{12} 的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 B_{12} 的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

利用莱士曼氏乳酸杆菌（*Lactobacillus leichmannii*）对维生素 B_{12} 的特异性和灵敏性，定量测定出试样中维生素 B_{12} 的含量。在测定用培养基中供给除维生素 B_{12} 以外的所有营养成分，这样微生物生长产生的透光率就会同标准曲线工作液及未知待测溶液中维生素 B_{12} 的含量相对应。以不同浓度标准溶液的透光率相对于各浓度水平标准物质的浓度绘制标准曲线，根据标准曲线即可计算出试样中维生素 B_{12} 的含量。

4 试剂和材料

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

4.1 菌株：莱士曼氏乳酸杆菌（*Lactobacillus leichmannii*）ATCC 7830。

4.2 维生素 B_{12} （Vitamin B_{12} 或 Cyanocobalamin）标准品：分子式 $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$，纯度≥99%。

4.3 培养基

4.3.1 乳酸杆菌琼脂培养基：见附录 A。

4.3.2 乳酸杆菌肉汤培养基：见附录 A。

4.3.3 维生素 B_{12} 测定用培养基：见附录 A。

注：一些商品化合成培养基效果良好，商品化合成培养基按标签说明进行配制。

4.4 9 g/L 氯化钠溶液（生理盐水）

称取 9.0 g 氯化钠溶解于 1000 mL 水中，分装于具塞试管，每管 10 mL。121 ℃灭菌 15 min。

4.5 乙醇溶液：体积分数为 25 %。

4.6 无水磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）。

4.7 无水偏重亚硫酸钠（$Na_2S_2O_5$）。

4.8 柠檬酸（含一个结晶水）（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）。

4.9 标准溶液的制备

4.9.1 维生素 B_{12} 贮备液（10 μg /mL）：精确称取维生素 B_{12} 标准品（4.2），用乙醇溶液（4.5）定容至维生素 B_{12} 浓度为 10 μg /mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.9.2 维生素 B_{12} 中间液（100 ng/mL）：用乙醇溶液（4.5）将 5.0 mL 维生素 B_{12} 贮备液（4.9.1）定容至 500 mL。

4.9.3 维生素 B_{12} 工作液（1 ng/mL）：用乙醇溶液（4.5）将 5.0 mL 维生素 B_{12} 中间液（4.9.2）定容至 500 mL。

4.9.4 标准曲线工作液：分别吸取两个 5 mL 维生素 B_{12} 工作液（4.9.3）于 250mL 和 500mL 容量瓶中，用水定容至刻度。高浓度溶液的浓度为 0.02 ng/mL；低浓度溶液的浓度为 0.01 ng/mL。

注：所有标准溶液要储存于冰箱内。4.9.1、4.9.2 和 4.9.3 保存期三个月，4.9.4 临用前配制。

5 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

5.1 天平：感量为 0.1 mg。

5.2 pH 计：精度≤0.01。

5.3 分光光度计。

5.4 涡旋混合器。

5.5 离心机：转速≥2000 转/分钟。

5.6 恒温培养箱：36 ℃ ± 1 ℃。

5.7 冰箱：2 ℃～5 ℃。

5.8 无菌吸管：10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器和吸头。

5.9 瓶口分液器：0 mL～10 mL。

5.10 锥形瓶：200 mL。

5.11 容量瓶（A 类）：100 mL，250 mL，500 mL。

5.12 单刻度移液管（A 类）：容量 5 mL。

5.13 漏斗：直径 90 mm。

5.14 定量滤纸：直径 90 mm。

5.15 试管：18 mm ×180 mm。

注：准备玻璃仪器时，使用活性剂对硬玻璃测定管及其他必要的玻璃器皿进行清洗，清洗之后要求在 200 ℃干热 2 h。

6 分析步骤

6.1 测试菌液的制备

6.1.1 将莱士曼氏乳酸杆菌（ATCC 7830）的冻干菌株（4.1）活化后，接种到乳酸杆菌琼脂培养基（4.3.1）上，36 ℃ ±1 ℃培养 24 h。再转种 2 代～3 代来增强活力。置 2 ℃～5 ℃冰箱保存备用。每 15 d 转种一次。

6.1.2 将活化后的菌株接种到乳酸杆菌肉汤培养基（4.3.2）中，36 ℃ ± 1 ℃培养 18 h～24 h，以 2000 转/分钟离心 2 min～3 min，弃去上清液，加入 10 mL 生理盐水（4.4），混匀，再离心 2 min～3 min，弃去上清液，再加入 10 mL 生理盐水（4.4），混匀。如前离心操作，弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水（4.4），混匀。吸适量该菌悬液于 10 mL 生理盐水（4.4）中，混匀制成测试菌液。

6.1.3 用分光光度计（5.3），以生理盐水（4.4）做空白，于 550 nm 波长下测测试菌液（6.1.2）的透光率，使其透光率在 60 %～80 %之间。

6.2 试样的处理

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.2.1 称取无水磷酸氢二钠（4.6）1.3 g，无水偏重亚硫酸钠（4.7）1.0 g，柠檬酸（含一个结晶水）（4.8）1.2 g，用 100 mL 水溶解。

6.2.2 称一定量的样品 (精确到 0.0001 g)，含维生素 B_{12} 约 50 ng ~100 ng，用 10 mL 的上述溶液（6.2.1）混合后，再加 150 mL 水，于 121 ℃水解 10 min，冷却后调 pH 至 4.5 ± 0.2，再用水定容至 250 mL，过滤。移取滤液 5 mL，加入水 20 mL～30 mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2，用水定容至 100 mL。最终溶液中维生素 B_{12} 的质量浓度约在 0.01 ng/mL～0.02 ng/mL，偏重亚硫酸钠的质量浓度小于 0.03 mg/mL。

6.3 标准曲线的制作

按表 1 顺序加入水、标准曲线工作液（4.9.4）和维生素 B_{12} 测定用培养基（4.3.3）于培养管中，一式三份。

表1 标准曲线的制作

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

6.4 待测液的制作

按表 2 顺序加水、样品溶液（6.2.2）和维生素 B_{12} 测定用培养基（4.3.3）于培养管内，一式三份。

表2 待测液的制作

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

6.5 灭菌

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

6.6 接种

将上述试管迅速冷却至 30 ℃以下。用滴管或移液器向上述试管中各滴加 1 滴（约 50 μL）测试菌液（6.1.2）（其中标准曲线管中空白 S1 除外）。

6.7 培养

将试管放入恒温培养箱内，36 ℃ ± 1 ℃培养 19 h～20 h。

6.8 测定

培养结束后，对每支试管进行目测检查，未接种试管 S1 内培养液应是澄清的，如果出现浑浊，则测定无效。

6.8.1 以接种空白管做对照，测定最高浓度标准曲线试管的透光率，2 h 后重新测定。两次结果透光率差值若小于 2 %，则取出全部检验管测其透光率。

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.8.3 用涡旋混合器（5.4）充分混合每一支试管（也可以加一滴消泡剂）后，立即将培养液移入比色皿内进行测定，波长为 550 nm，待读数稳定 30 s 后，读出透光率，每支试管稳定时间要相同。以维生素 B_{12} 标准品的含量为横坐标，透光率为纵坐标作标准曲线。

6.8.4 根据待测液的透光率，从标准曲线中查得该待测液中维生素 B_{12} 的浓度，再根据稀释因子和称样量计算出试样中维生素 B_{12} 的含量。透光率超出标准曲线管 S 3～S 10 范围的试样管要舍去。

6.8.5 对每个编号的待测液的试管，用每支试管的透光率计算每毫升该编号待测液维生素 B_{12} 的浓度，并计算该编号待测液的维生素 B_{12} 浓度平均值，每支试管测得的该浓度不得超过该平均值的±15 %，超过者要舍去。如果符合该要求的管数少于所有的四个编号的待测液的总管数的 2/3，用于计算试样含量的数据是不充分的，需要重新检验。如果符合要求的管数超过原来管数的 2/3，重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液中维生素 B_{12} 含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值为 C_x。用于计算试样中的维生素 B_{12} 含量。

注：绘制标准曲线，既可读取透光率（T %），也可读取吸光度（A）。

7 分析结果的表述

试样中维生素 B_{12} 的含量按公式（1）计算：

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

式中：

X——试样中维生素 B_{12} 的含量，单位为微克每百克表示（μg/100 g）；

C_x——6.8.5 中计算所得的总平均值，单位为纳克（ng）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

f——稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

9 其他

本标准检出限为 0.1 μg/100g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 乳酸杆菌琼脂培养基

A.1.1 成分

番茄汁 100 mL，三号蛋白胨 7.5 g，酵母浸膏 7.5 g，葡萄糖 10.0 g，磷酸二氢钾 2.0 g，聚山梨糖单油酸酯 1.0 g，琼脂 14.0 g，水 1000 mL，pH 6.8 ±0.1（25 ℃ ±5 ℃）。

A.1.2 制法

先将除琼脂以外的其他成分溶解于蒸馏水中，调节 pH，再加入琼脂，加热煮沸至完全溶解。混合均匀后分装试管，每管 10 mL。121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.2 乳酸杆菌肉汤培养基

A.2.1 成分

番茄汁 100 mL，三号蛋白胨 7.5 g，酵母浸膏 7.5 g，葡萄糖 10.0 g，磷酸二氢钾 2.0 g，聚山梨糖单油酸酯 1.0 g，水 1000 mL，pH 6.8 ± 0.1 （25 ℃ ± 5 ℃）。

A.2.2 制法

先将上述成分（A.2.1）溶解于水中，调节 pH，加热煮沸，混合均匀后分装试管，每管 10 mL。121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.3 维生素 B_{12} 测定用培养基

A.3.1 成分

无维生素酸水解酪蛋白 15.0 g，葡萄糖 40.0 g，天门冬酰胺 0.2 g，醋酸钠 20.0 g，抗环血酸 4.0 g，L-胱氨酸 0.4 g，DL-色氨酸 0.4 g，硫酸腺嘌呤 20.0 mg，盐酸鸟嘌呤 20.0 mg，尿嘧啶 20.0 mg，黄嘌呤 20.0 mg，核黄素 1.0 mg，盐酸硫胺素 1.0 mg，生物素 10.0 μg，烟酸 2.0 mg，p-氨基苯甲酸 2.0 mg，泛酸钙 1.0 mg，盐酸吡哆醇 4.0 mg，盐酸吡哆醛 4.0 mg，盐酸吡哆胺 800.0 μg，叶酸 200.0 μg，磷酸二氢钾 1.0 g，磷酸氢二钾 1.0 g，硫酸镁 0.4 g，氯化钠 20.0 mg，硫酸亚铁 20.0 mg，硫酸锰 20.0 mg，聚山梨糖单油酸酯（吐温 80）2.0 g，水 1000 mL，pH 6.0 ± 0.1（25 ℃ ± 5 ℃）。

A.3.2 制法

将上述成分溶解于水中，调节 pH，备用。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.15—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定

National food safety standard

Determination of vitamin niacin and niacinamide in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准第二法等同采用国际分析家学会（AOAC）944.13 Niacin and Niacinamide(Nicotinic Acid and Nicotinamide) in Vitamin Preparations。

本标准代替GB/T 5413.15-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 烟酸和烟酰胺的测定》。

本标准第二法与GB/T 5413.15-1997相比，主要变化如下：

——增加了光密度法测定；

——增加了淀粉类试样的测定；

——增加标准曲线绘制的文字描述。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.15-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定。

2 规范性引用性文件

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

第一法 高效液相色谱法

3 原理

试样经热水提取、酸性沉淀蛋白质后，以 C_{18} 色谱柱分离，用紫外检测器定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 盐酸。

4.3 氢氧化钠。

4.4 盐酸(2.4 mol/L)：准确移取 10 mL 盐酸（4.2）于 50 mL 容量瓶中，用水定容。

4.5 氢氧化钠溶液（2.5 mol/L）：称取 5.0g 氢氧化钠（4.3）于 50 mL 容量瓶中，用水定容。

4.6 高氯酸（$HClO_4$）：体积分数为 60%。

4.7 甲醇（CH_4O）：色谱纯。

4.8 异丙醇(C_3H_8O)：色谱纯。

4.9 庚烷磺酸钠($C_7H_{15}NaO_3S$)：优级纯。

4.10 标准溶液

4.10.1 烟酸及烟酰胺标准储备液（1.0 mg/mL）：称取烟酸及烟酰胺标准品各 0.1 g（精确到 0.0001 g），分别置于 100 mL 容量瓶中，用水溶解定容。

4.10.2 烟酸及烟酰胺混合标准中间液（40 μg/mL）：分别准确吸取烟酸及烟酰胺标准储备液（4.10.1）2 mL 至 50 mL 定量瓶中，用水定容。临用前配制。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.10.3 烟酸及烟酰胺混合标准系列测定液：分别准确吸取烟酸及烟酰胺混合标准中间液（4.10.2）0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL，至 50 mL 容量瓶中用水定容。该标准系列浓度分别为 0.00 μg/mL、0.80 μg/mL、1.60 μg/mL、4.00 μg/mL、8.00 μg/mL。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

5.2 pH 计：精度为 0.01。

5.3 超声波振荡器。

5.4 天平：感量为 0.1 mg。

5.5 培养箱：30 ℃～80 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样的预处理

6.1.1 含淀粉的试样：称取混合均匀固体试样约 5.0 g（精确到 0.0001 g）加入约 25 mL 45 ℃～50 ℃的水，或称取混合均匀液体试样约 20.0 g（精确到 0.0001 g）于 150 mL 锥形瓶中，再加入约 0.5 g 淀粉酶（4.1），摇匀后向锥形瓶中充氮，盖上瓶塞，置于 50 ℃～60 ℃的培养箱内培养约 30 min，取出冷却至室温。

6.1.2 不含淀粉的试样：称取混合均匀固体试样约 5.0 g（精确到 0.0001 g）加入约 25 mL 45 ℃～50 ℃的水，或称取混合均匀液体试样约 20.0 g（精确到 0.0001 g）于 150 mL 锥形瓶中，振摇，静置 5 min～10 min，充分溶解，并冷却至室温。

6.1.3 提取：将上述锥形瓶置于超声波振荡器中振荡约 10 min。

6.1.4 沉淀及定容：待试样溶液降至室温后，用盐酸（4.4）调节试样溶液的 pH 值至 1.7 ±0.1，放置约 2 min 后，再用氢氧化钠溶液（4.5）调节试样溶液的 pH 值至 4.5 ±0.1。将试样溶液转至 50 mL 容量瓶中，用水反复冲洗锥形瓶，洗液合并于 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀后经滤纸过滤，滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜加压过滤，用试管收集，即为试样待测液。

6.2 参考色谱条件

色谱柱：C_{18} 柱（粒径5 μm，150 mm ×4.6 mm）或具有同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）70 mL，异丙醇（4.8）20 mL，庚烷磺酸钠（4.9）1 g，用910 mL水溶解并混匀后，用高氯酸（4.6）调pH至2.1 ± 0.1，经0.45 μm膜过滤。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：261 nm。

柱温：25 ℃。

进样量：10 μL。

6.3 定量分析

6.3.1 标准曲线绘制

将烟酸及烟酰胺混合标准系列测定液（4.10.3）依次进行色谱测定（其标准样品色谱图参见附录 A 中图 A.1.1）。记录各组分的色谱峰面积或峰高，以峰面积或峰高为纵坐标，以标准测定液的浓度为横坐标，绘制标准曲线。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.3.2 试样测定

将试样待测液（6.1.4）进行色谱测定。记录各组分色谱峰面积或峰高，根据标准曲线计算出试样待测液中烟酸及烟酰胺各组分的浓度 c_i。

7 分析结果的表述

7.1 试样中烟酸或烟酰胺含量的计算

试样中烟酸或烟酰胺的含量按（1）式计算：

$$X_{1或2}=\frac{c_i\times V\times 100}{m} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

$X_{1或2}$——试样中烟酸或烟酰胺的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

c_i——试样待测液中烟酸或烟酰胺的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样溶液的体积，单位为毫升（mL）。

7.2 试样中维生素烟酸总含量的计算

试样中维生素烟酸的总含量按（2）式计算：

$$X=X_1+X_2 \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

X——试样中维生素烟酸的总含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

X_1——试样中烟酸的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

X_2——试样中烟酰胺的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

第二法 微生物法

9 原理

利用植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 对烟酸和烟酰胺的特异性，在含有烟酸和烟酰胺的样品中生长产生的酸度和形成的光密度来测定烟酸和烟酰胺的含量。

10 试剂和材料

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

10.1 硫酸溶液 A（10 mol/L）：将质量分数为 95 %～98 %的浓硫酸 560 mL 缓慢加入到 600 mL 水中，边加边搅拌，冷却后定容至 1000 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.2 硫酸溶液 B（1 mol/L）：吸取 100 mL 10 mol/L 的硫酸溶液 A（10.1），转移至 1000 mL 容量瓶用水定容。

10.3 氢氧化钠溶液 A（3.75 mol/L）：称取 150 g 氢氧化钠于 1000 mL 烧杯中，用 400 mL 水溶解，冷却至室温后，转移至 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

10.4 氢氧化钠溶液 B（0.375 mol/L）：吸取 100 mL 氢氧化钠溶液 A（10.3）转移至 1000 mL 容量瓶用水定容。

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

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

$$c=\frac{\mathrm{m}}{(V_1-V_2)\times 0.2042} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

c——氢氧化钠的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m——邻苯二甲酸氢钾的质量，单位为克（g）；

V_1——氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升（mL）；

V_2——空白试验氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升（mL）。

10.5.2 酚酞溶液：称取 0.5 g 酚酞溶于 75 mL 体积分数为 95 %的乙醇中，并加入 20mL 水，加入氢氧化钠标准滴定溶液（10.5），直至加入一滴立即变成粉红色，再加入水定容至 100 mL。

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

10.7 乙醇溶液：体积分数为 25 %。量取 250 mL 无水乙醇，加入 750 mL 水，混匀。

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

10.9 培养基（或可使用商品化的合成培养基）

10.9.1 乳酸杆菌琼脂培养基：光解胨 15 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，琼脂 10 g，加蒸馏水至 1000 mL，pH6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。 121℃高压灭菌 15min，备用。

10.9.2 乳酸杆菌肉汤培养基：光解胨 15g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，加蒸馏水至 1000 mL，pH 6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。121℃高压灭菌 15min，备用。

10.9.3 烟酸测定用培养基：维生素测定用酸水解酪蛋白氨基酸（Casamino Acids）12 g，葡萄糖 40 g，乙酸钠 20 g，L-胱氨酸 0.4 g，DL-色氨酸 0.2 g，盐酸腺嘌呤 20 mg，盐酸鸟嘌呤 20 mg，尿嘧啶 20 mg，盐酸硫胺素 200 μg，泛酸钙 200 μg，盐酸吡哆醇 400 μg，核黄素 400 μg，p-氨基苯甲酸 100 μg，生物素 0.8 μg，磷酸氢二钾 1 g，磷酸二氢钾 1 g，硫酸镁 0.4 g，氯化钠 20 mg，硫酸亚铁 20 mg，硫酸锰 20 mg。加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.7 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。

10.10 标准溶液

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.10.1　烟酸标准贮备液（100 μg/mL）：在五氧化二磷干燥器中取出已干燥的烟酸标准品，称取 50.0 mg (精确至 0.1 mg)，用乙醇溶液（10.7）溶解并定容至 500 mL，2 ℃～4 ℃冰箱冷藏，保存期为 4 个月。

10.10.2　烟酸标准中间溶液（10 μg/mL）：从烟酸标准贮备液（10.10.1）中吸取 10 mL 至 100 mL 容量瓶，用乙醇溶液（10.7）定容，2 ℃～4 ℃冰箱冷藏，保存期为 1 个月。

10.10.3　烟酸标准工作液（100 ng/mL）：从标准中间液（10.10.2）中吸取 5.0 mL，用水稀释至 500 mL。临用前配制。

10.11　0.9 %生理盐水：称 0.9 g 氯化钠于 100 mL 容量瓶中，稀释至刻度，振荡溶解。分装于具塞试管中，每管 10 mL，121 ℃灭菌 15 min，每周准备一次。

10.12　溴麝香草酚蓝指示剂：称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于研钵中，加入 1.6 mL 氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）研磨，加少许水至完全溶解，转移至 250 mL 容量瓶中用水定容。

11　仪器和设备

11.1　分光光度仪。

11.2　pH 计：精度为 0.01。

11.3　涡旋振荡器。

11.4　天平：感量为 0.1 mg。

11.5　生化培养箱：36 ℃ ±1 ℃。

11.6　离心机：转速≥2000 转/分钟。

11.7　滴定管：分刻度值为 0.1 mL。

12　分析步骤

12.1　测试菌液的制备

12.1.1　把植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 冻干菌粉转入乳酸杆菌肉汤培养基（10.9.2）试管中，36 ℃ ± 1℃培养 24 h，转接至乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管中，36 ℃ ± 1 ℃再培养 24 h。培养好的乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管的培养物作为贮备菌种。

12.1.2　从贮备菌种培养基上分别转接到三个乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管中，放入培养箱中 36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h。每月转接一次，作为月接种管贮于冰箱中。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

12.1.3　从月接种的培养管中的一支再接种一支乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管，36 ℃ ±1 ℃培养 24 h，作为日接种管每日测定用。

12.1.4　从日接种管中接种一管乳酸杆菌肉汤培养基（10.9.2），36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h。在无菌条件下离心该培养液 10 min（2000 转/分钟），弃去上清液。用 10 mL 生理盐水（10.11）振荡洗涤菌体，离心 10 min（2000 转/分钟），弃去上清液，再加入 10 mL 生理盐水（10.11）振荡清洗。如前离心操作，弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水（10.11），混匀。吸取适量该菌悬液于 10 mL 生理盐水（10.11）中，混匀制成测试菌液。

12.1.5　以生理盐水（10.11）做对照，用分光光度计于 550 nm 波长下，测测试菌液（12.1.4）的透光率，此值应在 60 %～80 %之间。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

12.2 试样的制备

称取 2 g（精确至 0.0001 g）固态试样或 5 g（精确至 0.0001 g）液态试样（约含烟酸 0.1 mg）于 250 mL 三角烧瓶中，加 20 mL 的硫酸溶液 B（10.2）溶解试样，放入高压灭菌釜中 121 ℃保持 30 min，取出冷却至室温。用氢氧化钠溶液 A（10.3）和氢氧化钠溶液 B（10.4）调 pH 至 6.0～6.5，再用盐酸（10.6），调 pH 至 4.5 ± 0.1，用水定容至 100 mL，过滤。吸取 25 mL 滤液于 100 mL 烧杯中，用氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）调 pH 至 6.8 ± 0.1，转入 250 mL 容量瓶中定容。

12.3 标准曲线管的制作

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准溶液和培养基于试管中，表 1 中每一编号需制作 3 管。试管 S2 至 S7 中，相当烟酸含量为 0 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng。

表 1 标准曲线管的制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
蒸馏水（mL）	5	5	4	3	2	1	0
标准溶液（mL）	0	0	1	2	3	4	5
培养基（mL）	5	5	5	5	5	5	5

12.4 试样管的制作

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

表 2 试样管的制作

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

12.5 灭菌

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

注：保证加热和冷却过程中条件均匀，灭菌管数过多或距离太近，在灭菌锅中都可产生不良影响。

12.6 接种

在无菌条件下，向上述每管中各加入一滴（约 50 μL）测试菌液（12.1.4），加盖，充分振荡混匀所有试管（标准曲线未接种空白管 S1 除外）。

12.7 培养

12.7.1 酸度法：在 36 ℃ ± 1 ℃，培养 72 h。通过对每个试管的目测检查，未接种试管内培养液应是澄清的，标准曲线管和试样管中培养液的浊度应有梯度。未接种管若混浊，则测定无效。

12.7.2 光密度法：在 36 ℃ ± 1 ℃，培养 16 h～24 h。其他同 12.7.1。

12.8 测定

12.8.1 酸度法

12.8.1.1 用 10 mL 水将未接种空白管 S1 和接种空白管 S2 的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（10.12）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）滴定标准曲线管中未接种空白管 S 1 和接种空白管 S 2。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

12.8.1.2　用 10 mL 水将标准曲线管和试样管中的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（10.12）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）滴定标准曲线管和试样管的培养物。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

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

12.8.2　光密度法

以接种空白管（表 1 中试管号 S 2）作对照，取出最高浓度标准曲线管 S 7，振荡 5 s，在波长 550 nm 条件下读取光密度值，放回重新培养。2 h 后同等条件重新测该管的光密度，如果两次光密度的绝对差结果≤2 %，则取出全部检验管测定标准溶液和试样的光密度。

12.9　标准曲线的绘制

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

12.10　试样管中烟酸含量的计算

按照 12.8 每个试样管测定消耗的氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数或光密度值，从标准曲线中查得对应的烟酸含量。每一编号的三个试样管应计算管中每毫升测定液烟酸的含量，并与其平均值相比较。相对偏差小于 15 %的试管为有效试管，无效试样管应舍去，有效试样管总数应大于所有试样管总数的 2/3。重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液烟酸含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x。

注：样品管中烟酸含量低于 100 ng，高于 500 ng 的值应舍去。

13　分析结果的表述

试样中烟酸（烟酰胺）含量按式（4）计算：

$$X=\frac{C_x}{m}\times\frac{f}{1000}\times 100 \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

X——试样中烟酸（烟酰胺）含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_x—— 12.10 中计算所得的总平均值，单位为纳克（ng）；

f——稀释倍数；

m——试样的质量或体积，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

14　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

15　其他

本标准第一法检出限为：烟酸30 μg/100 g，烟酰胺40 μg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图

A.1 烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图

烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

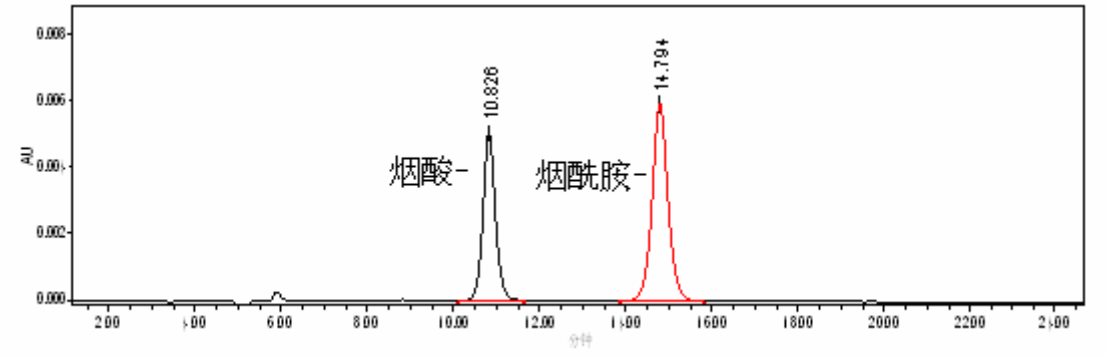


图 A.1 烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.16—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定

National food safety standard

Determination of folic acid (folate activity) in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5413.16-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 叶酸（叶酸盐活性）测定》。

本标准与GB/T 5413.16-1997相比，主要变化如下：

——对磷酸盐缓冲液作了调整；

——增加了米粉的处理方法；

——增加了光密度法测定步骤。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.16-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中叶酸（叶酸盐活性）的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

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

4 试剂和材料

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

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

4.2 0.9 %生理盐水：称取 9.0 g 氯化钠溶解于 1000 mL 水中，分装于具塞试管中，每管 10 mL，121℃灭菌 15 min。每周准备一次。

4.3 磷酸盐缓冲液

4.3.1 磷酸盐缓冲液Ⅰ（0.05 mol/L）：称取 5.85 g 磷酸二氢钾，1.22 g 磷酸氢二钾，用 1000 mL 水溶解。临用前按 0.5 g/100 mL 加入抗坏血酸。

4.3.2 磷酸盐缓冲液Ⅱ（用于谷物及谷物制品前处理）：称取 14.2 g 磷酸氢二钠，用 1000 mL 水溶解。临用前按 1.0 g/100 mL 加入抗坏血酸，用氢氧化钠溶液 A（4.16）调 pH 至 7.8±0.1。

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

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

4.4 叶酸标准品。

4.5 氨水（10.8 %）。

4.6 甲苯（C_7H_8）。

4.7 抗坏血酸（$C_6H_8O_6$）。

4.8 菌株：干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）ATCC 7469。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.9 培养基

4.9.1 乳酸杆菌琼脂培养基：胨化乳 15 g，酵母浸膏 5 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，琼脂 10 g，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。121℃高压灭菌 15min，备用。

4.9.2 乳酸杆菌肉汤培养基：胨化乳 15 g，酵母浸膏 5 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。121℃高压灭菌 15min，备用。

4.9.3 叶酸测定用培养基：酪蛋白胨 10 g，葡萄糖 40 g，乙酸钠 40 g，磷酸氢二钾 1 g，磷酸二氢钾 1 g，DL-色氨酸 0.2 g，L-天门冬氨酸 0.6 g，L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g，硫酸腺嘌呤 10 mg，盐酸鸟嘌呤 10 mg，尿嘧啶 10 mg，黄嘌呤 20 mg，聚山梨糖 0.1 g，谷光甘肽 5 mg，硫酸镁 0.4 g，氯化钠 20 mg，硫酸亚铁 20 mg，硫酸锰 15 mg，核黄素 1 mg，p-氨基苯甲酸 2 mg，维生素 B_6 4mg，盐酸硫胺素 400 μg，泛酸钙 800 μg，烟酸 800 μg，生物素 20 μg，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.7 ± 0.1（20 ℃～25 ℃）。

注：市售商业化合成培养基效果更稳定。

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

4.11 木瓜蛋白酶溶液：1 g 蛋白酶（活力≥6000 U/mg，pH 6.0 ± 0.1，40 ℃）溶于 100 mL 磷酸盐缓冲液Ⅰ（4.3.1）中。临用前配制。

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

4.13 0.22 μm 灭菌滤膜。

4.14 标准溶液的制备

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

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

或简化为：

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

式中：

m——叶酸标准品的质量，单位为毫克（mg）；

c——叶酸标准品的纯度，单位为克每百克（g/100 g）。

用水稀释溶液至刻度，用吸管加水至计算要求的体积，充分混合，放入棕色试剂瓶中 2 ℃～4 ℃冰箱冷藏，保存期为 4 个月。

4.14.2 叶酸标准中间液（50 μg/mL）：吸取 10 mL 叶酸标准贮备液（4.14.1）于 100 mL 棕色容量瓶中，用水定容至刻度，充分混匀，2 ℃～4 ℃冰箱冷藏，保存期为 1 个月。

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

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

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

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

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

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

式中：

c——氢氧化钠的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m——称取的邻苯二甲酸氢钾的质量，单位为克（g）；

V_1——氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升（mL）；

V_2——空白试验氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升（mL）。

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

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

5　仪器和设备

5.1　pH 计：精度为 0.01。

5.2　离心机：转速≥2000 转/分钟。

5.3　分光光度仪。

5.4　天平：感量为 0.1 mg。

5.5　生化培养箱：36 ℃±1 ℃

5.6　滴定管：分刻度值为 0.1 mL。

5.7　涡旋振荡器。

6　分析步骤

6.1　测试菌液的制备

6.1.1　干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）ATCC 7469 冻干菌粉转入乳酸杆菌肉汤培养基（4.9.2）中， 36 ℃±1 ℃培养 24 h 后，转接至乳酸杆菌琼脂培养基（4.9.1）试管中，再 36 ℃ ±1 ℃培养 24 h。培养好的乳酸杆菌琼脂培养基（4.9.1）试管的培养物作为贮备菌种。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.1.2 从贮备菌种培养基上分别转接到三个乳酸杆菌琼脂培养基(4.9.1)试管中,放入培养箱中 36 ℃±1 ℃培养 24 h。每月转接一次，作为月接种管贮于冰箱中。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

6.1.3 从月接种的培养管中的一支再接种一支乳酸杆菌琼脂培养基(4.9.1)试管，36 ℃±1 ℃培养 24 h，作为日接种管每日测定用。

6.1.4 从日接种管中接种一管乳酸杆菌肉汤培养基（4.9.2），36 ℃±1 ℃培养 24 h。在无菌条件下离心该培养液 10 min（2000 转/分钟），弃去上清液。用 10 mL 生理盐水（4.2）振荡洗涤菌体，离心 10 min（2000 转/分钟），弃去上清液，用 10 mL 生理盐水（4.2）振荡清洗。如前离心操作，弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水（4.2），混匀。吸 1 mL 该菌悬液于 10 mL 生理盐水（4.2）中，混匀制成测试菌液。

6.1.5 以生理盐水（4.2）做对照，用分光光度计，于 550 nm 波长下，测测试菌液（6.1.4）的光密度值，此值应在 60 %～80 %之间。

6.2 试样的制备

6.2.1 乳制品

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

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

6.2.2 谷物及谷物制品

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

若确定样品中强化叶酸与原生叶酸相比所占比例很大则可以直接在样品中加 20 mL 0.05 mol/L 含抗坏血酸的磷酸缓冲液Ⅱ（4.3.2）和 50 mL 水，于 121 ℃灭菌 15 min，然后吸取 1mL 澄清滤液，再用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 III（4.3.3）稀释，得到浓度约为 0.1 ng/mL 的叶酸盐溶液。

6.3 标准曲线管的制作

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1 标准曲线管的制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
蒸馏水（mL）	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
标准溶液（mL）	0	0	1	2	3	4	5	3	4	5
培养基（mL）	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
注 1：试管 S3～S7 中加低浓度标准工作液。 注 2：试管 S8～S10 中加高浓度标准工作液。										

6.4 试样管的制作

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

表 2 试样管的制作

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

6.5 灭菌

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

注：保证加热和冷却过程中条件均匀，灭菌管数过多或距离太近，在灭菌锅中都可产生不良影响。

6.6 接种

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

6.7 培养

6.7.1 酸度法：36 ℃ ± 1 ℃培养 72 h。对每支试管进行目测检查，未接种管内培养液应是澄清的，标准曲线管和试样管中培养液的浊度应有梯度。未接种管中若出现混浊，则测定无效。

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

6.8 测定

6.8.1 酸度法

6.8.1.1 用 10 mL 水将未接种空白管 S1 和接种空白管 S2 的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（4.19）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（4.18）滴定标准曲线未接种空白管 S 1 和接种空白管 S 2。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

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

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

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

6.8.2 光密度法

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

6.9 标准曲线的绘制

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

6.10 试样管中叶酸含量的计算

按照 13.8 每个试样管测定的消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数或光密度值，从标准曲线中查得对应的叶酸含量。每一编号的三个试样管应计算管中每毫升测定液叶酸的含量，并与其平均值相比较。相对偏差小于 15 %的试管为有效试管，无效试样管应舍去，有效试样管总数应大于所有试样管总数的 2/3。重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液叶酸含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x。

注：样品管中叶酸含量低于 0.05 ng，高于 0.5 ng 的值应舍去。

7 分析结果的表述

试样中叶酸含量按式（3）计算：

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

式中：

X——试样中叶酸含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_x——6.10 中计算所得的总平均值，单位为纳克（ng）；

D——样品在处理后的稀释因子；

EB——鸡胰腺空白管中叶酸含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

m——样品的质量或体积，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过算术平均值的 10 %。

9 其他

本标准检出限为 2 μg/100g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.17—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准第一法为等同采用国际分析家学会（AOAC）945.74 Pantothenic Acid in Vitamin Preparations。

本标准代替GB/T 5413.17-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 泛酸的测定》。

本标准与GB/T 5413.17-1997相比，第一法主要变化如下：

——增加了 tris 缓冲液配制方法；

——确定了测定波长；

——增加了标准曲线绘制的文字描述。

第二法主要变化如下：

——更换了色谱柱；

——改变了流动相；

——增加了含淀粉类试样进行酶解的处理方法。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.17-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 微生物法

3 原理

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

4 试剂和材料

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

4.1 0.9 %生理盐水：9.0 g 氯化钠溶解于 1000 mL 水中，分装于具塞试管中，每管 10 mL，121 ℃灭菌 15 min。每周准备一次。

4.2 泛酸钙标准品。

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

4.4 甲苯（C_7H_8）。

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

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

4.7 培养基

4.7.1 乳酸杆菌琼脂培养基：光解胨 15 g，酵母浸膏 5 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，琼脂 10 g，加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。

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

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

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

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

4.10 标准溶液

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

4.10.2 泛酸中间贮备液（1 μg/mL）：取 25 mL 标准贮备液（4.10.1），加入蒸馏水 500 mL，乙酸溶液 10 mL（4.3），乙酸钠溶液 100 mL（4.5），再用水稀释至 1 L。加 0.5 mL 甲苯（4.4）贮于冰箱中（2 ℃～4 ℃），保存期为 1 个月。

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

5 仪器和设备

5.1 分光光度仪。

5.2 pH 计：精度为 0.01。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 天平：感量 0.1 mg。

5.5 生化培养箱：36 ℃ ± 0.5 ℃。

5.6 离心机：转速≥2000 转/分钟。

6 分析步骤

6.1 测试菌液的制备

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

6.1.2 从贮备菌种培养基上分别转接到三个乳酸杆菌琼脂培养基（4.7.1）试管中，放入培养箱中 36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h。每月转接一次，作为月接种管贮于冰箱中。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

6.1.3 从月接种的培养管中的一支再接种一支乳酸杆菌琼脂培养基（4.7.1）试管，36 ℃±1 ℃培养 24 h，作为日接种管每日测定用。

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

6.2　试样的处理

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

6.3　标准曲线的制作

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

表 1 标准曲线管制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
蒸馏水（mL）	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
标准溶液（mL）	0	0	1	2	3	4	5	3	4	5
培养基（mL）	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
注 1：试管 S3～S7 中加低浓度的为标准溶液。 注 2：试管 S8～S10 中加高浓度的为标准溶液。										

6.4　试样管的制作

按表 2 顺序加入蒸馏水、试样和培养基于试管中，一式三份。

表 2 试样管的制作

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

6.5　灭菌

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

注：保证加热和冷却过程中条件均匀，灭菌管数过多或距离太近，在灭菌锅中都可产生不良影响。

6.6　接种

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

6.7　培养

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

6.8　测定

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

6.9 标准曲线的绘制

以标准曲线管泛酸含量作横坐标，以光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

6.10 试样管中泛酸含量的计算

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

注：样品管中泛酸含量低于 5 ng，高于 50 ng 的值应舍去。

7 分析结果的表述

试样中泛酸含量按式（1）计算：

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

式中：

X——试样中泛酸含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_x——6.10 中计算所得的总平均值，单位为微克（μg）；

f——稀释倍数；

m——试样的质量，单位为克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

第二法 高效液相色谱法

9 原理

试样经热水提取等前处理后，经 C_{18} 色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量泛酸的含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

10.1 淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

10.2 甲醇(CH_4O)：色谱纯。

10.3 盐酸。

10.4 硫酸锌($ZnSO_4$)。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

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

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

10.8 泛酸标准溶液

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

泛酸浓度=泛酸钙浓度×0.920

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

11 仪器和设备

11.1 天平：感量为 0.1 mg。

11.2 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

11.3 超声波。

11.4 pH 计：精度为 0.01。

11.5 培养箱：55 ℃ ± 2 ℃。

12 分析步骤

12.1 试样处理

12.1.1 不含淀粉类试样处理

称取混合均匀的固态试样约5 g（精确至0.0001 g）或液态试样约20 g（精确至0.0001 g）于150 mL三角瓶中，固体试样加入约30 mL 40 ℃～50 ℃温水，振摇溶解后超声萃取20 min。

12.1.2 含淀粉类试样处理

如果试样中含有淀粉，称取混合均匀的固态试样约5 g（精确到0.0001 g）或液态试样约20 g（精确到0.0001 g）于150mL三角瓶中，加入淀粉酶（10.1）约0.2 g, 固体试样加入约30 mL 40 ℃～50 ℃温水振摇溶解，盖上瓶塞，在50 ℃～60 ℃条件下酶解30 min。

12.2 测定液的制备

试样溶液降至室温后，用盐酸（10.5）调节 pH 至 4.5 ± 0.1，加入 5 mL 硫酸锌溶液（10.6），充分混合。转入 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度并充分混匀后，用滤纸过滤。滤液经 0.45 μm 滤膜过滤后，即为试样待测液。

12.3 参考色谱条件

色谱柱：ODS-C_{18}（粒径 5 μm， 250 mm×4.6 mm ）或具有同等性能的色谱柱。

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

流速：1.0 mL/min。

检测波长：200 nm。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

柱温：30 ℃ ± 1 ℃。

进样量：10 μL。

12.4 测定

12.4.1 标准曲线测定

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

将上述泛酸标准工作依次进行色谱测定（其标准样品色谱图见附录A中图A.1），记录色谱峰高（或峰面积）。以峰高（或峰面积）为纵坐标，以标准工作液浓度为横坐标绘制标准曲线。

12.4.2 试样溶液的测定

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

13 分析结果的表述

试样中泛酸的含量按式（2）计算：

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

式中：

X——试样中泛酸含量，单位为微克每百克（μg/100 g）

C——试样溶液中泛酸的质量浓度，单位为微克毫升（μg/mL）；

m ——称取试样的质量，单位为克（g）；

V——被测样液总体积，单位为毫升（mL）；

K——样液稀释倍数。

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

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

15 其他

本标准第二法检出限为 100 μg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
泛酸标准溶液的液相色谱图

A.1 泛酸标准溶液的液相色谱图

泛酸标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

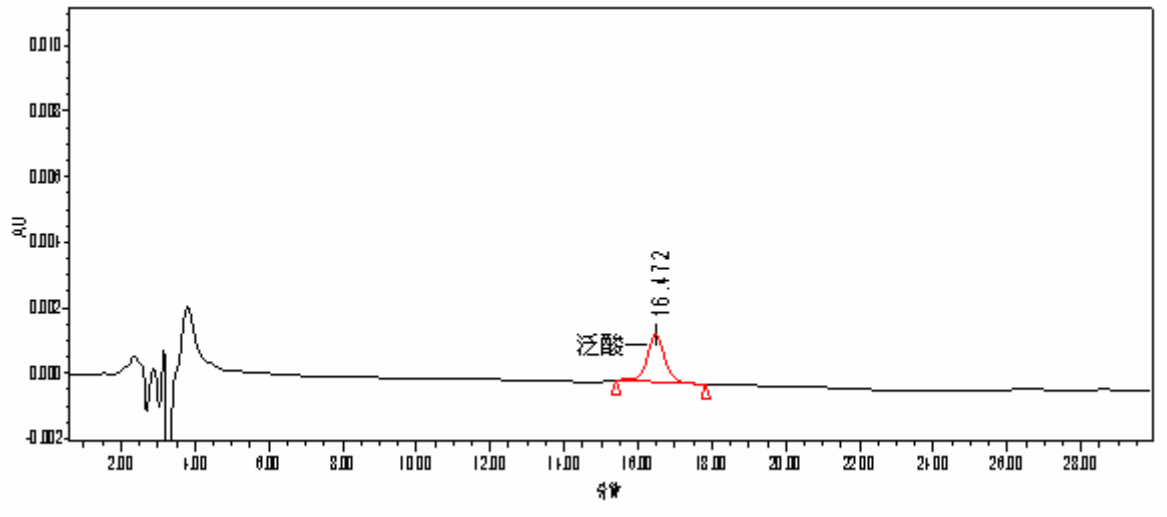


图 A.1　泛酸标准溶液的液相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.18—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素C的测定

National food safety standard

Determination of vitamin C in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.18-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素C的测定》。

本标准与GB/T 5413.18-1997相比，主要变化如下：

——明确了酶的活力单位；

——改变了邻苯二胺溶液浓度；

——含淀粉试样处理进行了改变；

——增加了加入硼酸—乙酸钠溶液后的反应时间；

——增加了加入邻苯二胺溶液后的反应时间。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.18-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素C的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素C的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素C的测定。本标准测定的是还原型维生素C和氧化型维生素C的总量。

2 规范性引用文件

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

3 原理

维生素C（抗坏血酸）在活性炭存在下氧化成脱氢抗坏血酸，它与邻苯二胺反应生成荧光物质，用荧光分光光度计测定其荧光强度，其荧光强度与维生素C的浓度成正比，以外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

4.1 淀粉酶：酶活力1.5 U/mg，根据活力单位大小调整用量。

4.2 偏磷酸—乙酸溶液A：称取15 g偏磷酸及40 mL乙酸（36 %）于200 mL水中，溶解后稀释至500 mL备用。

4.3 偏磷酸—乙酸溶液B：称取15 g偏磷酸及40 mL乙酸（36 %）于100 mL水中，溶解后稀释至250 mL备用。

4.4 酸性活性炭：称取粉状活性炭（化学纯，80目～200目）约200 g，加入1 L体积分数为10 %的盐酸，加热至沸腾，真空过滤，取下结块于一个大烧杯中，用水清洗至滤液中无铁离子为止，在110℃～120℃ 烘箱（5.3）中干燥约10 h后使用。

检验铁离子的方法：普鲁士蓝反应。将20 g/L亚铁氰化钾与体积分数为1 %的盐酸等量混合，将上述洗出滤液滴入，如有铁离子则产生蓝色沉淀。

4.5 乙酸钠溶液：用水溶解500 g三水乙酸钠，并稀释至1 L。

4.6 硼酸—乙酸钠溶液：称取3.0 g硼酸，用乙酸钠溶液（4.5）溶解并稀释至100 mL，临用前配制。

4.7 邻苯二胺溶液（400 mg/L）：称取40 mg邻苯二胺，用水溶解并稀释至100 mL，临用前配制。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.8 维生素 C 标准溶液（100 μg/mL）：称取 0.050 g 维生素 C 标准品，用偏磷酸—乙酸溶液 A（4.2）溶解并定容至 50 mL，再准确吸取 10.0 mL 该溶液用偏磷酸—乙酸溶液 A（4.2）稀释并定容至 100 mL，临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 荧光分光光度计。

5.2 天平：感量为 0.1 mg。

5.3 烘箱：温度可调。

5.4 培养箱：45 ℃ ±1 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 含淀粉的试样：称取约 5 g（精确至 0.0001 g）混合均匀的固体试样或约 20 g（精确至 0.0001 g）液体试样（含维生素 C 约 2 mg）于 150 mL 三角瓶中，加入 0.1 g 淀粉酶（4.1），固体试样加入 50 mL 45 ℃～50 ℃的蒸馏水，液体试样加入 30mL 45 ℃～50 ℃的蒸馏水，混合均匀后，用氮气排除瓶中空气，盖上瓶塞，置于 45 ℃ ± 1 ℃培养箱（5.4）内 30 min，取出冷却至室温，用偏磷酸—乙酸溶液 B（4.3）转至 100 mL 容量瓶中定容。

6.1.2 不含淀粉的试样：称取混合均匀的固体试样约 5 g（精确至 0.0001 g），用偏磷酸—乙酸溶液 A（4.2）溶解，定容至 100 mL。或称取混合均匀的液体试样约 50 g（精确至 0.0001 g），用偏磷酸—乙酸溶液 B（4.3）溶解，定容至 100 mL。

6.2 待测液的制备

6.2.1 将上述试样（6.1.1，6.1.2）及维生素 C 标准溶液（4.8）转至放有约 2 g 酸性活性炭（4.4）的 250 mL 三角瓶中，剧烈振动，过滤（弃去约 5 mL 最初滤液），即为试样及标准溶液的滤液。然后准确吸取 5.0 mL 试样及标准溶液的滤液分别置于 25 mL 及 50 mL 放有 5.0 mL 硼酸—乙酸钠溶液（4.6）的容量瓶中，静置 30 min 后，用蒸馏水定容。以此作为试样及标准溶液的空白溶液。

6.2.2 在此 30 min 内，再准确吸取 5.0 mL 试样及标准溶液的滤液于另外的 25 mL 及 50 mL 放有 5.0 mL 乙酸钠溶液（4.5）和约 15 mL 水的容量瓶中，用水稀释至刻度。以此作为试样溶液及标准溶液。

6.2.3 试样待测液：分别准确吸取 2.0 mL 试样溶液（6.2.2）及试样的空白溶液(6.2.1)于 10.0 mL 试管中，向每支试管中准确加入 5.0 mL 邻苯二胺溶液（4.7），摇匀，在避光条件下放置 60 min 后待测。

6.2.4 标准系列待测液：准确吸取上述标准溶液（6.2.2）0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 和 2.0 mL，分别置于 10 mL 试管中，再用水补充至 2.0 mL。同时准确吸取标准溶液的空白溶液（6.2.1）2.0 mL 于 10 mL 试管中。向每支试管中准确加入 5.0 mL 邻苯二胺溶液（4.7），摇匀，在避光条件下放置 60 min 后待测。

6.3 测定

6.3.1 标准曲线的绘制

将标准系列待测液（6.2.4）立刻移入荧光分光光度计的石英杯中，于激发波长 350 nm，发射波长 430 nm 条件下测定其荧光值。以标准系列荧光值分别减去标准空白荧光值为纵坐标，对应的维生素 C 质量浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.3.2 试样待测液的测定

食品伙伴网http://www.foodmate.net

将试样待测液（6.2.3）按 6.3.1 的方法分别测其荧光值，试样溶液荧光值减去试样空白溶液荧光值后在标准曲线上查得对应的维生素 C 质量浓度。

7 分析结果的表述

试样中维生素 C 的含量按式(1)计算：

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \times \frac{100}{1000} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X——试样中维生素 C 的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

V——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

c——由标准曲线查得的试样测定液中维生素 C 的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

f——试样稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留至小数点后一位。

8 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

9 其他

本标准检出限为 0.1 mg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.19—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定

National food safety standard

Determination of free biotin in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.19-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 游离生物素的测定》。

本标准附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.19-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

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

4 试剂和材料

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

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

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

4.3 培养基

4.3.1 乳酸杆菌琼脂培养基：见附录 A。

4.3.2 乳酸杆菌肉汤培养基：见附录 A。

4.3.3 生物素测定用培养基：见附录 A。

注：一些商品化合成培养基效果良好，商品化合成培养基按标签说明进行配制。

4.4 乙醇溶液（50 %）。

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

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

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

4.8 标准溶液的制备

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

4.8.2 生物素标准中间液（1 μg/mL）：吸取 1 mL 生物素标准贮备液（4.8.1），用乙醇溶液（4.4）定容至 100 mL。

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

4.8.4 标准曲线工作液

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

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

5 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

5.1 天平：感量为 0.1 mg。

5.2 pH 计：精度≤0.02。

5.3 分光光度计。

5.4 涡旋混合器。

5.5 离心机：转速≥2000 转/分钟。

5.6 恒温培养箱：36 ℃ ±1 ℃。

5.7 冰箱：2 ℃～5 ℃。

5.8 无菌吸管：10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器或吸头。

5.9 瓶口分液器：0 mL～10 mL。

5.10 锥形瓶：200 mL。

5.11 容量瓶（A 类）：100 mL，250 mL，500 mL。

5.12 单刻度移液管（A 类）：容量 5 mL。

5.13 漏斗：直径 90 mm。

5.14 定量滤纸：直径 90 mm。

5.15 试管：18mm×180 mm。

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

6 分析步骤

6.1 接种菌悬液的制备

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

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

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

6.2 样品的处理

6.2.1 干粉样品

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

6.2.2 液体样品

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

6.2.3 样品的提取

食品伙伴网http://www.foodmate.net

加入硫酸溶液（4.5）100 mL，121 ℃水解 30 min，冷却后用氢氧化钠溶液（4.6）调节 pH 至 4.5±0.2，定量转到 250 mL 容量瓶中，用水定容，充分混合。用滤纸过滤，弃去最初的几毫升。吸取滤液 5 mL，加入约 20 mL 水，用氢氧化钠溶液（4.6）调 pH 为 6.8±0.2, 定量转到 100 mL 容量瓶中，用水定容。

6.3 标准曲线的制作

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

表1 标准曲线的制作

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

6.4 待测液的制作

按表 2 顺序加水、样品溶液（6.2.3）和生物素测定用培养基（4.3.3）于培养管内，一式三份。

每份样品需带样品空白试管一只，管内分别加入5 mL待测液和5 mL培养基。

表2 待测液的制作

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

6.5 灭菌

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

6.6 接种

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

6.7 培养

将试管放入培养箱内，36 ℃ ±1 ℃培养19 h～20 h。

6.8 测定

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

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

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

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

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

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

7 分析结果的表述

试样中生物素的含量按公式（1）计算：

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

式中：

X——试样中生物素的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_x——6.8.5 中计算所得的总平均值，单位为纳克（ng）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

f——稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

9 其他

本标准检出限为 20.0 μg/kg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 乳酸杆菌琼脂培养基

A.1.1 成分

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

A.1.2 制法

在 A.1.1 中加入 10.0 g 琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。混合均匀后分装试管，每管 10 mL。121 ℃高压灭菌 15 min，备用。

A.2 乳酸杆菌肉汤培养基

A.2.1 成分

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

A.2.2 制法

将 A.2.1 成分加热煮沸，混合均匀后分装试管，每管 10 mL。121 ℃高压灭菌 15 min。

A.3 生物素测定用培养基

A.3.1 成分

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

A.3.2 制法

将上述成分溶解于水中，调节 pH，备用。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.21—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰的测定

National food safety standard

Determination of calcium，iron，zinc，sodium，potassium，magnesium，copper and manganese in foods for infants and young children， milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.21-1997《婴幼儿配方食品和乳粉　钙、铁、锌、钠、钾、 镁、铜、和锰的测定》。

本标准与GB/T 5413.21-1997相比，主要变化如下：

——第一法中增加了可以直接购买有证标准溶液；

——第一法中修改了标准储备液及标准工作液的配制浓度；

——第一法中修改了试样处理稀释步骤；

——增加了第二法电感耦合等离子体原子发射光谱测定方法。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.21-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中钾、钠、钙、镁、锌、铁、铜和锰的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中钾、钠、钙、镁、锌、铁、铜和锰的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 火焰原子吸收分光光度法

3 原理

试样经干法灰化，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钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜和锰原子对特定波长谱线的吸收。测定钙、镁时，需用镧作释放剂，以消除磷酸干扰。

4 试剂和材料

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

4.1 盐酸。

4.2 硝酸（HNO_3）。

4.3 氧化镧（La_2O_3）。

4.4 氯化钾：分子量74.55，光谱纯。

4.5 氯化钠：分子量58.44，光谱纯。

4.6 碳酸钙：分子量100.05，光谱纯。

4.7 纯镁：光谱纯。

4.8 纯锌：光谱纯。

4.9 铁粉：光谱纯。

4.10 金属铜：光谱纯。

4.11 金属锰：光谱纯。

4.12 盐酸 A（2 %）：取 2mL 盐酸（4.1），用水稀释至 100 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.13　盐酸 B（20 %）：取 20 mL 盐酸（4.1），用水稀释至 100 mL。

4.14　硝酸溶液（50%）：取 50 mL 硝酸（4.2），用水稀释至 100 mL。

4.15　镧溶液（50 g/L）：称取 29.32 g 氧化镧（4.3），用 25 mL 去离子水湿润后，缓慢添加 125 mL 盐酸（4.1）使氧化镧溶解后，用去离子水稀释至 500 mL。

4.16　钾标准溶液（1000 μg/mL）：称取干燥的氯化钾（4.4）1.9067 g，用盐酸 A（4.12）溶解，并定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.17　钠标准溶液（1000 μg/mL）：称取干燥的氯化钠（4.5）2.5420 g，用盐酸 A（4.12）溶解，并定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.18　钙标准溶液（1000 μg/mL）：称取干燥的碳酸钙（4.6）2.4963 g，用盐酸 B（4.13）100 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.19　镁标准溶液（1000 μg/mL）：称取纯镁（4.7）1.0000 g，用硝酸（4.14）40 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.20　锌标准溶液（1000 μg/mL）：称取金属锌（4.8）1.0000 g，用硝酸（4.14）40 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.21　铁标准溶液（1000 μg/mL）：称取金属铁粉（4.9）1.0000 g，用硝酸（4.14）40 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.22　铜标准溶液（1000 μg/mL）：称取金属铜（4.10）1.0000 g，用硝酸（4.14）40 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.23　锰标准溶液（1000 μg/mL）：称取金属锰（4.11）1.0000 g，用硝酸（4.14）40 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。

4.24　各元素的标准储备液

钙、铁、锌、钠、钾、镁标准储备液：分别准确吸取钙标准溶液（4.18）10.0 mL、铁标准溶液（4.21）10.0 mL、锌标准溶液（4.20）10.0 mL、钠标准溶液（4.17）5.0 mL、钾标准溶液（4.16）10.0 mL、镁标准溶液（4.19）1.0 mL，用盐酸 A（4.12）分别定容到 100 mL 石英容量瓶中，得到上述各元素的标准储备液。质量浓度分别为：钙、铁、锌、钾：100.0 μg/mL；钠：50.0 μg/mL；镁：10.0 μg/mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

锰、铜标准储备液：准确吸取锰标准溶液（4.23）10.0 mL，用盐酸 A（4.12）定容到 100 mL，再从定容后溶液中准确吸取 4.0 mL，用盐酸 A（4.12）定容到 100 mL，得到锰标准储备液。准确吸取铜标准溶液（4.22）10.0 mL，用盐酸 A（4.12）定容到 100 mL，再从定容后溶液中准确吸取 6.0 mL，用盐酸 A（4.12）定容到 100 mL，得到铜标准储备液。质量浓度分别为：锰：4.0 μg/mL；铜：6.0 μg/mL。

5 仪器和设备

5.1 原子吸收分光光度计。

5.2 钙、铁、锌、钠、钾、镁、铜、锰空心阴极灯。

5.3 分析用钢瓶乙炔气和空气压缩机。

5.4 石英坩埚或瓷坩埚。

5.5 马弗炉。

5.6 天平：感量为 0.1 mg。

6 分析步骤

6.1 试样处理

称取混合均匀的固体试样约 5 g 或液体试样约 15 g（精确到 0.0001 g）于坩埚（5.4）中，在电炉上微火炭化至不再冒烟，再移入马弗炉（5.5）中，490 ℃±5 ℃灰化约 5 h。如果有黑色炭粒，冷却后，则滴加少许硝酸溶液（4.14）湿润。在电炉上小火蒸干后，再移入 490 ℃高温炉中继续灰化成白色灰烬。冷却至室温后取出，加入 5 mL 盐酸 B（4.13），在电炉上加热使灰烬充分溶解。冷却至室温后，移入 50 mL 容量瓶中，用水定容，同时处理至少两个空白试样。

6.2 试样待测液的制备

6.2.1 钙、镁待测液

从 50 mL 的试液（6.1）中准确吸取 1.0 mL 到 100 mL 容量瓶中，加 2.0 mL 镧溶液（4.15），用水定容。同样方法处理空白试液。

6.2.2 钠待测液

从 50 mL 的试液（6.1）中准确吸取 1.0 mL 到 100 mL 容量瓶中，用盐酸 A（4.12）定容。同样方法处理空白试液。

6.2.3 钾待测液

从 50 mL 的试液（6.1）中准确吸取 0.5 mL 到 100 mL 容量瓶中，用盐酸 A（4.12）定容。同样方法处理空白试液。

6.2.4 铁、锌、锰、铜待测液

用 50 mL 的试液（6.1）直接上机测定。同时测定空白试液（6.1）。

6.2.5 为保证试样待测试液浓度在标准曲线线性范围内，可以适当调整试液定容体积和稀释倍数。

6.3 测定

6.3.1 标准曲线的制备

6.3.1.1 标准系列使用液的配制

按表 1 给出的体积分别准确吸取各元素的标准储备液于 100 mL 容量瓶中，配制铁、锌、钠、钾、

食品伙伴网http://www.foodmate.net

锰、铜使用液，用盐酸 A（4.12）定容。配制钙镁使用液时，在准确吸取标准储备液的同时吸取 2.0 mL 镧溶液（4.15）于各容量瓶，用水定容。此为各元素不同浓度的标准使用液，其质量浓度见表 2。

表 1 配制标准系列使用液所吸取各元素标准储备液的体积

序号	K（mL）	Ca（mL）	Na（mL）	Mg（mL）	Zn（mL）	Fe（mL）	Cu（mL）	Mn（mL）
1	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
2	2.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
3	3.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
4	4.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
5	5.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

表 2　各元素标准系列使用液浓度

序号	K（μg/mL）	Ca（μg/mL）	Na（μg/mL）	Mg（μg/mL）	Zn（μg/mL）	Fe（μg/mL）	Cu（μg/mL）	Mn（μg/mL）
1	1.0	2.0	1.0	0.2	2.0	2.0	0.12	0.08
2	2.0	4.0	2.0	0.4	4.0	4.0	0.24	0.16
3	3.0	6.0	3.0	0.6	6.0	6.0	0.36	0.24
4	4.0	8.0	4.0	0.8	8.0	8.0	0.48	0.32
5	5.0	10.0	5.0	1.0	10.0	10.0	0.60	0.40

6.3.1.2　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的最佳状态，选用灵敏吸收线 K 766.5 nm、Ca 422.7 nm、Na 589.0 nm、Mg 285.2 nm、Fe 248.3 nm、Cu 324.8 nm、Mn 279.5 nm、Zn 213.9 nm 将仪器调整好预热后，测定铁、锌、钠、钾、铜、锰时用毛细管吸喷盐酸 A（4.12）调零。测定钙镁时先吸取镧溶液（4.15）2.0 mL，用水定容到 100 mL，并用毛细管吸喷该溶液调零。分别测定各元素标准工作液的吸光度。以标准系列使用液浓度为横坐标，对应的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

6.3.2　试样待测液的测定

调整好仪器最佳状态，测铁、锌、钠、钾、铜、锰用盐酸 A（4.12）调零，测钙、镁先时，先吸取镧溶液（4.15）2.0 mL，用水定容到 100 mL，并用该溶液调零。分别吸喷试样待测液的吸光度及空白试液的吸光度。查标准曲线得对应的质量浓度。

7　分析结果的表述

试样中钙、镁、钠、钾、铁、锌的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(c_1 - c_2) \times V \times f}{m \times 1000} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中各元素的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c_1——测定液中元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_2——测定空白液中元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——样液体积，单位为毫升（mL）；

f——样液稀释倍数；

m——试样的质量，单位为克（g）。

试样中锰、铜的含量按式（2）计算：

食品伙伴网http://www.foodmate.net

$$X = \frac{(c_1 - c_2) \times V \times f}{m} \times 100 \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中各元素的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

c_1——测定液中元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_2——测定空白液中元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——样液体积，单位为毫升（mL）；

f——样液稀释倍数；

m——试样的质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，钙、镁、钠、钾、锰、铜、铁、锌结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值，钙、镁、钠、钾、铁、锌不得超过算术平均值的 10 %；铜和锰不得超过算术平均值的 15 %。

第二法 电感耦合等离子体原子发射光谱测定方法

9 原理

试样经干法灰化消解，稀释至合适体积后用电感耦合等离子体原子发射光谱仪测定，外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为优级纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

10.1 盐酸。

10.2 硝酸(HNO_3)。

10.3 硝酸溶液（50%）：取 50 mL 硝酸（10.2），用水稀释至 100 mL。

10.4 盐酸 A（4 %）：取 4 mL 盐酸（10.1），用水稀释至 100 mL。

10.5 盐酸 B（40 %）：取 40 mL 盐酸（10.1），用水稀释至 100 mL。

10.6 8 种元素标准储备溶液：单元素标准储备溶液可按 GB/T 602 方法配制，也可使用有证国家标准物质，其质量浓度为 1.0 mg/mL(或 0.5 mg/mL)。

11 仪器和设备

11.1 电感耦合等离子体原子发射光谱仪。

11.2 天平：感量为 1 mg。

11.3 马弗炉。

11.4 电炉：1 kW～2 kW。

11.5 瓷坩埚。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

12 分析步骤

12.1 试样制备

试样为粉末状样品，分析前应将试样充分混匀；试样为较大颗粒样品，应分取适量样品粉碎后测定。

12.2 试样处理

称取5 g试样（精确至0.001 g）于瓷坩埚中，在电炉上微火炭化至不冒烟，移入马弗炉中550 ℃加热2 h，如有黑色炭粒，冷却后加少许硝酸溶液（10.3）湿润，小火蒸干后再移入马弗炉中550 ℃加热半小时，取出冷却，加盐酸B（10.5）5 mL，在电炉上小心加热使灰分充分溶解，冷却后转移至25 mL容量瓶中，用水定容至刻度，若有沉淀需过滤。待测。

12.3 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

12.4 空白试验

除不加试样外，其它均按试样处理和测定步骤进行。

12.5 仪器参考操作条件

功率：1.20 kW，等离子气流量：15 L/min，雾化器压力：200 kPa，辅助气流量：1.50 L/min，仪器稳定延时：15 s，进样延时：20 s，读数次数：3次，各元素推荐使用分析谱线见表3。

表3 元素推荐使用分析谱线

元素名称	分析谱线波长（nm）
Ca	315.887， 317.933
Mg	279.553，280.270
Fe	234.350，238.204，259.940
Mn	257.610
Cu	324.754，327.395
Zn	202.548，206.200
K	766.491
Na	588.995，589.592

12.6 混合标准溶液的配制

由储备液用盐酸A（10.4）逐级稀释配成如表4浓度系列的混合标准溶液。

表4 混合标准溶液各元素的浓度

序号	Ca（μg/mL）	Mg（μg/mL）	Fe（μg/mL）	Mn（μg/mL）	Cu（μg/mL）	Zn（μg/mL）	K（μg/mL）	Na（μg/mL）
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10.0	0.5	5.0	0.1	0.2	5.0	10.0	1.0
3	15.0	1.0	10.0	0.2	0.4	10.0	20.0	3.0
4	20.0	1.5	15.0	0.3	0.6	15.0	30.0	5.0
5	25.0	2.0	20.0	0.4	0.8	20.0	40.0	7.0

食品伙伴网http://www.foodmate.net

12.7 测定

参考12.5的条件对仪器进行优化后，依次测定标准溶液、空白溶液和试样溶液。若试样溶液中某元素浓度超出工作曲线范围，可用盐酸A（10.4）对试样溶液进行适当稀释后再测定。

13 分析结果的表述

按式（3）计算各元素的含量：

$$X = \frac{100 \times (c_1 - c_2) \times V \times f}{1000 \times m} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X——被测元素含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c_1——试样溶液中元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_2——空白溶液中元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f——试样溶液稀释倍数；

m——试样的质量，单位为克（g）。

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

14 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

15 其他

本标准第一法检出限：钙 1.0 mg/100 g，镁 0.3 mg/100 g，铁 0.020 mg/100 g，锰 0.001 mg/100 g，铜 0.0045 mg/100 g，锌 0.02 mg/100 g，钾 0.2 mg/100 g，钠 1.5 mg/ 100 g。

本标准第二法检出限：钙 0.7 mg/100 g，镁 0.2 mg/100 g，铁 0.003 mg/100 g，锰 0.005 mg/100 g，铜 0.002 mg/100 g，锌 0.002 mg/100 g，钾0.7 mg/100 g，钠 1.6 mg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.22—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中磷的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.22-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 磷的测定》。

本标准与GB/T 5413.22-1997相比，主要变化如下：

——由硝酸-硫酸-高氯酸三种强酸消化修改为硝酸-高氯酸消化。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.22-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中磷的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中磷的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中磷的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样经酸氧化，使磷在硝酸溶液中与钒钼酸铵生成黄色络合物。用分光光度计在波长 440 nm 处测定吸光度，其颜色的深浅与磷的含量成正比。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 硝酸：优级纯。

4.2 高氯酸：优级纯。

4.3 钼酸铵[（NH_4）$_6Mo_7O_{24}$ • $4H_2O$]。

4.4 偏钒酸铵(NH_4VO_3)。

4.5 氢氧化钠(NaOH)。

4.6 磷酸二氢钾标准品(KH_2PO_4)。

4.7 2,6-二硝基酚或 2,4-二硝基酚[$C_6H_3OH(NO_2)_2$]。

4.8 硫酸：优级纯。

4.9 钒钼酸铵试剂

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

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

4.10 氢氧化钠溶液（6 mol/L）：称取 240 g 氢氧化钠，溶于 1000 mL 水中。

4.11 氢氧化钠溶液（0.1 mol/L）：称取 4g 氢氧化钠，溶于 1000 mL 水中。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.12　硝酸溶液（0.2 mol/L）：吸取 12.5 mL 硝酸，用水稀释至 1000 mL。

4.13　磷的标准贮备液（50μg/mL）：称取在 105 ℃ ± 1℃烘干至恒重的磷酸二氢钾标准品（4.6）0.2197 g，溶于 400 mL 水中，加 8 mL 硫酸（4.8），定容至 1 L。可长久贮存。

4.14　二硝基酚指示剂（2 g/L）：称取 0.2 g 2,6-二硝基酚或 2,4-二硝基酚（4.7）溶于 100 mL 水中。

5　仪器和设备

5.1　天平：感量为 0.1 mg。

5.2　电热板。

5.3　分光光度计。

6　分析步骤

6.1　试样处理

固体试样称取0.5 g，液体试样称取2.5 g（精确至0.1 mg），于125 mL三角瓶中，放入几粒玻璃球，加10 mL硝酸（4.1），然后放在电热板（5.2）上加热。待剧烈反应结束后取下，稍冷却，再加入10 mL高氯酸（4.2），重新放于电热板上加热。若消化液变黑，需取下再加入5 mL硝酸（4.1）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 mL～5 mL时取下，冷却，转入50 mL容量瓶中，定容。同时做空白试验。

6.2　标准曲线的制作

6.2.1　分别吸取磷的标准贮备液（4.13）0 mL，2.5 mL，5 mL，7.5 mL，10 mL，15 mL，分别放入 50 mL 容量瓶中。

6.2.2　加入 10.00 mL 钒钼酸铵试剂（4.9），用水定容至刻度。该系列标准溶液中磷的浓度分别为 0 μg/mL，2.5 μg/mL，5 μg/mL，7.5 μg/mL，10 μg/mL，15 μg/mL。在 25 ℃～30 ℃下显色 15 min。用 1 cm 光径比色皿，于波长 440 nm 处测定吸光值。以吸光值为纵坐标，以磷的浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.3　试样测定

吸取试液（6.1）10 mL 于 50 mL 容量瓶中，加少量水后，加 2 滴二硝基酚指示剂（4.14），先用氢氧化钠溶液（4.10）调至黄色，再用硝酸溶液（4.12）调至无色，最后用氢氧化钠溶液（4.11）调至微黄色。以下按 6.2.2 自“加入 10.00 mL 钒钼酸铵试剂……”依法操作。以空白溶液调零。从标准曲线上查得试样溶液中磷的浓度。

7　分析结果的表述

试样中磷的含量按式（1）计算。

$$X = \frac{c \times V \times V_2}{m \times V_1 \times 1000} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中磷的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c——从标准曲线中查得试样溶液中磷的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样消化后定容体积，单位为毫升（mL）；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

V_1——吸取样液体积，单位为毫升（mL）；
V_2——比色液定容体积，单位为毫升（mL）；
m——样品的质量，单位为克（g）。
以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5 %。

9 其他

本标准的检出限为 2 mg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.23—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中碘的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.23-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 碘的测定》

本标准与GB/T 5413.23-1997相比，主要变化如下：

——填充色谱柱改为石英毛细管柱；

——增加了检出限。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.23-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中碘的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中碘的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中碘的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样中的碘在硫酸条件下与丁酮反应生成丁酮与碘的衍生物，经气相色谱分离，电子捕获检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 高峰氏（Taka-Diastase）淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 碘化钾（KI）或碘酸钾（KIO_3）：优级纯。

4.3 丁酮（C_4H_8O）：色谱纯。

4.4 硫酸（H_2SO_4）：优级纯。

4.5 正已烷（C_6H_{14}）。

4.6 无水硫酸钠（Na_2SO_4）。

4.7 双氧水（3.5%）：吸取 11.7 mL 体积分数为 30 %的双氧水稀释至 100 mL。

4.8 亚铁氰化钾溶液（109 g/L）：称取 109 g 亚铁氰化钾，用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

4.9 乙酸锌溶液（219 g/L）：称取 219 g 乙酸锌，用水定容于 1000 mL 容量瓶中。

4.10 碘标准溶液。

4.10.1 碘标准贮备液（1.0 mg/mL）：称取 131 mg 碘化钾（4.2）（精确至 0.1 mg）或 168.5 mg 碘酸钾（4.2）（精确至 0.1 mg），用水溶解并定容至 100 mL，5 ℃ ±1 ℃冷藏保存，一个星期内有效。

4.10.2 碘标准工作液（1.0 μg/mL）：吸取 10 mL 碘标准贮备液，用水定容至 100 mL 混匀，再吸取 1.0 mL，用水定容至 100 mL 混匀，临用前配制。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5 仪器和设备

5.1 天平：感量为0.1 mg。

5.2 气相色谱仪，带电子捕获检测器。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 不含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样 5 g，液体试样 20 g（精确至 0.0001 g）于 150 mL 三角瓶中，固体试样用 25 mL 约 40 ℃的热水溶解。

6.1.2 含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样 5 g，液体试样 20 g（精确至 0.0001 g），于 150 mL 三角瓶中，加入 0.2 g 高峰氏淀粉酶(4.1)，固体试样用 25 mL 约 40℃的热水充分溶解，置于 50 ℃～60 ℃恒温箱中酶解 30 min，取出冷却。

6.2 试样测定液的制备

6.2.1 沉淀：将上述处理过的试样溶液转入 100 mL 容量瓶中，加入 5 mL 亚铁氰化钾溶液（4.8）和 5 mL 乙酸锌溶液（4.9）后，用水定容至刻度，充分振摇后静止 10 min。滤纸过滤后吸取滤液 10 mL 于 100 mL 分液漏斗中，加 10 mL 水。

6.2.2 衍生与提取：向分液漏斗中加入 0.7 mL 硫酸（4.4），0.5 mL 丁酮（4.3），2.0 mL 双氧水（4.7），充分混匀，室温下保持 20 min 后加入 20 mL 正己烷（4.5）振荡萃取 2 min。静止分层后，将水相移入另一分液漏斗中，再进行第二次萃取。合并有机相，用水洗涤两到三次。通过无水硫酸钠过滤脱水后移入 50mL 容量瓶中用正己烷定容，此为试样测定液。

6.3 碘标准测定液的制备

分别吸取 1.0 mL，2.0 mL，4.0 mL，8.0 mL，12.0 mL 碘标准工作液（4.10.2），相当于 1.0 μg、2.0 μg、4.0 μg、8.0 μg、12.0 μg 的碘，其他分析步骤同 6.2。

6.4 测定

6.4.1 参考色谱条件

色谱柱：填料为 5 %氰丙基-甲基聚硅氧烷的毛细管柱（柱长 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μm）或具同等性能的色谱柱。

进样口温度：260 ℃。

ECD 检测器温度：300 ℃。

分流比：1：1。

进样量：1.0 μL。

程序升温见表 1：

表 1 程序升温

升温速率（℃/ min）	温度（℃）	持续时间（min）
	50	9
30	220	3

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.4.2 标准曲线的制作

将碘标准测定液（6.3）分别注入到气相色谱仪中（色谱图参见附录 A）得到标准测定液的峰面积（或峰高）。以标准测定液的峰面积（或峰高）为纵坐标，以（6.3）碘标准工作液中碘的质量为横坐标制作标准曲线。

6.4.3 试样溶液的测定

将试样测定液（6.2）注入到气相色谱仪中得到峰面积（或峰高），从标准曲线中获得试样中碘的含量（μg）。

7 分析结果的表述

试样中碘含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C_s}{m} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中碘含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_s——从标准曲线中获得试样中碘的含量，单位为微克（μg）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留至小数点后一位。

8 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

9 其他

本标准检出限为 2.0 μg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
碘标准衍生物气相色谱图

A.1 碘标准衍生物气相色谱图

碘标准衍生物气相色谱图见图 A.1。

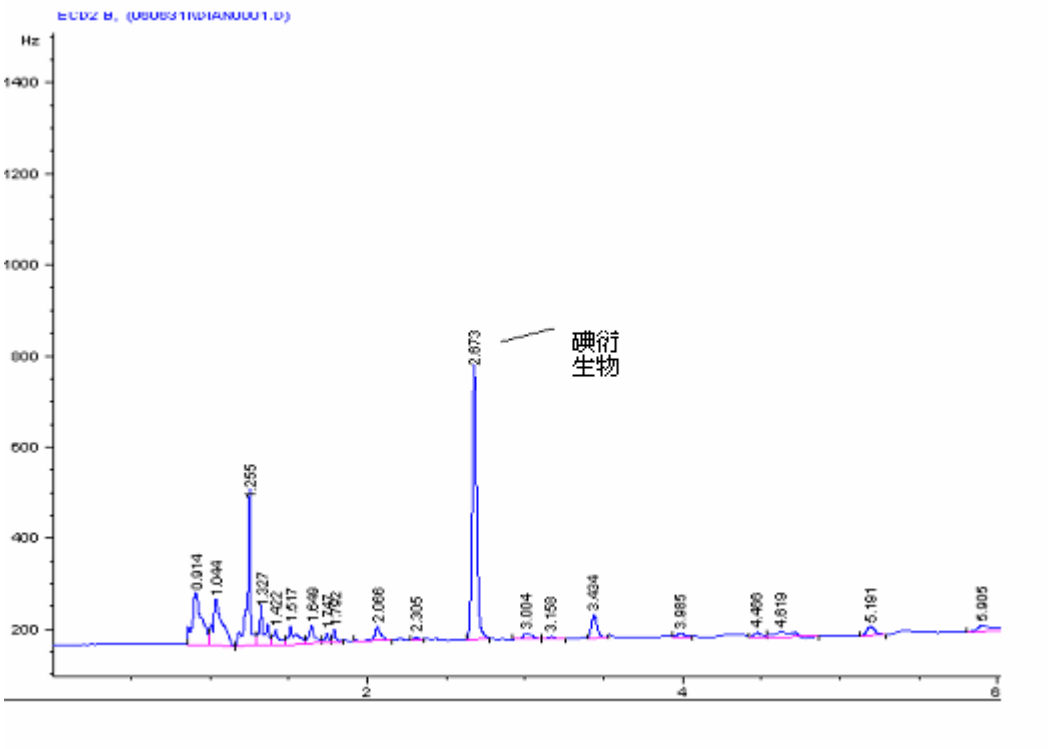


图 A.1 碘标准衍生物气相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.24—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中氯的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.24-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 氯的测定》。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.24-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中氯的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中氯的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中氯的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 电位滴定法

3 原理

试样经酸化处理后，加入丙酮，以玻璃电极为参比电极，银电极为指示电极，用硝酸银标准滴定溶液滴定试液中的氯离子，根据电位的“突跃”，确定滴定终点。按硝酸银标准滴定溶液的消耗量，计算试样中氯的含量。

4 试剂和材料

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

4.1 亚铁氰化钾（$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$）。

4.2 乙酸锌（$Zn(CH_3CO_2)_2$）。

4.3 冰乙酸（CH_3COOH）。

4.4 硝酸（HNO_3）。

4.5 丙酮（C_3H_6O）。

4.6 氯化钠标准品（NaCl）。

4.7 硝酸银标准品（$AgNO_3$）。

4.8 蛋白质沉淀剂

4.8.1 沉淀剂Ⅰ：称取 106 g 亚铁氰化钾（4.1），溶于水中，转移到 1000 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。

4.8.2 沉淀剂Ⅱ：称取 220 g 乙酸锌(4.2)，溶于水中，并加入 30 mL 冰乙酸（4.3），转移到 1000 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。

4.9 硝酸溶液（1+3）：1 体积硝酸（4.4）与 3 体积水混匀。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.10 氯化钠基准溶液（0.01 mol/L）：称取 0.5844 g 经 500 ℃±50 ℃烘至恒重的氯化钠标准品（4.6），于 100 mL 烧杯中，用少量水溶解，转移到 1000 mL 容量瓶中，稀释至刻度，摇匀。

4.11 硝酸银标准滴定溶液（0.02 mol/L）

4.11.1 配制：称取 3.40 g（精确至 0.01 g）硝酸银标准品（4.7），于 100 mL 烧杯中，用少量水溶解后转移到 1000 mL 容量瓶中，用水定容，摇匀，避光贮存，或转移到棕色容量瓶中。

4.11.2 标定（二级微商法）：吸取 10.00 mL 氯化钠基准溶液（4.10）于 50 mL 烧杯中，加入 0.2 mL 硝酸（4.4）及 25 mL 丙酮（4.5）。将玻璃电极和银电极浸入溶液中，启动电磁搅拌器。

从滴定管滴入 V 毫升硝酸银标准滴定溶液（所需量的 90 %），测量溶液电位值（E）。继续滴入硝酸银标准滴定溶液，每滴加 1 mL 立即测量溶液电位值（E）。接近终点和终点过后，每滴加 0.1 mL 测量溶液电位值（E）。继续滴入硝酸银标准滴定溶液，直至溶液电位数值不再明显改变。按表 1 示例格式记录每次滴入硝酸银标准滴定溶液的体积数值和电位数值。

4.11.3 滴定终点的确定：根据滴定记录（4.11.2），按硝酸银标准滴定溶液的体积数值（V）和电位数值（E），按表 1 示例的列表方式计算 ΔE、ΔV、一级微商和二级微商值列入表中。

表1 硝酸银标准滴定溶液滴定氯化钠基准溶液的记录示例

V	E	ΔE[a]	ΔV[b]	一级微商[c] ($\Delta E/\Delta V$)	二级微商[d]
0.00	400	70	4.00	18	22
4.00	470	20	0.5	40	60
4.50	490	10	0.1	100	50
4.60	500	15	0.1	150	50
4.70	515	20	0.1	200	650
4.80	535	85	0.1	850	−350
4.90	620	50	0.1	500	−300
5.00	670	20	0.1	200	−100
5.10	690	10	0.1	100	−
5.20	700	−	−	−	

[a] 相对应的电位变化的数值。
[b] 连续滴入硝酸银标准滴定溶液的体积增加的数值。
[c] 单位体积硝酸银标准滴定溶液引起的电位变化的数值，即 ΔE 与 ΔV 的比值。
[d] 相当于相邻的一级微商的数值之差。

当一级微商最大、二级微商等于零时，即为滴定终点，按式(1)计算滴定终点时硝酸银标准滴定溶

食品伙伴网http://www.foodmate.net

液的量(V_1)。

$$V_1 = V_a + \left(\frac{a}{a-b} \Delta V \right) \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

V_1——滴定终点时消耗硝酸银标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_a——在 a 时消耗硝酸银标准滴定溶液的体积，单位为毫升（mL）；

a——二级微商为零前的二级微商值；

b——二级微商为零后的二级微商值；

ΔV——a与b之间的数值，单位为毫升（mL）。

示例：

从表中找出一级微商最大值为 850，则二级微商等于零时应在 650 与－350 之间，所以 a = 650，b = －350， V= 4.8 mL， ΔV = 0.10mL。

$$V_1 = V_a + \left(\frac{a}{a-b} \Delta V \right) = 4.8 + \left[\frac{650}{650-(-350)} \times 0.10 \right] = 4.8 + 0.065 = 4.87 \text{（mL）}$$

即滴定终点时，硝酸银标准滴定溶液的用量为4.87 mL。

4.11.4 硝酸银标准滴定溶液浓度按式（2）计算。

$$c_2 = \frac{10 c_1}{V_1} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

c_2——硝酸银标准滴定溶液的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

c_1——氯化钠基准溶液浓度的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1——滴定终点时消耗硝酸银标准滴定溶液的体积的数值，单位为毫升（mL）。

5 仪器和设备

5.1 pH 计：精度为 0.1。

5.2 玻璃电极。

5.3 银电极。

5.4 电磁搅拌器。

5.5 滴定管：10 mL。

5.6 天平：感量为0.1 mg，1 mg。

6 分析步骤

6.1 试液的制备

称取约 20 g（精确至 0.001 g）试样，于 250 mL 锥形瓶中，加入 100 mL70 ℃热水沸腾后保持 15 min，并不断摇动。取出，冷却至室温，依次加入 4 mL 沉淀剂Ⅰ（4.8.1）和 4 mL 沉淀剂Ⅱ（4.8.2）。每次

食品伙伴网http://www.foodmate.net

加入后充分摇匀，在室温静置 30 min。将锥形瓶中的内容物全部转移到 200 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。用滤纸过滤，弃去最初部分滤液。

6.2 分析步骤

取 10 mL 试液（6.1），于 50 mL 烧杯中，加入 5 mL 硝酸溶液（1+3）（4.9）及 25 mL 丙酮（4.5)。以下按第 4.11.2 步骤操作，并按 4.11.4 计算滴定到终点时消耗硝酸银标准滴定溶液的体积数值（V_2）。

7 分析结果的表述

7.1 结果计算

试样中氯的含量以质量分数X_1计，数值以毫克每百克（mg/100 g）表示，按式(3)计算：

$$X_1 = \frac{35.5 \times c_2 \times V_2 \times f}{m_1} \times 100 \quad \cdots\cdots(3)$$

式中：

X_1——试样中氯的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

35.5——与1.00 mL硝酸银标准滴定溶液[c（$AgNO_3$）=1.000 mol/L]相当的氯质量数值，单位为毫克（mg）；

V_2——滴定试样时消耗硝酸银标准滴定溶液的体积，单位为毫升（mL）；

f——稀释倍数；

m_1——试样的质量，单位为克（g）；

c_2——硝酸银标准滴定溶液的准确数值，单位为摩尔每升（mol/L）。

7.2 结果表示

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过算术平均值的5 %。

第二法 沉淀滴定法

9 原理

有机酸沉淀样品中的蛋白质，用硝酸银溶液滴定试样中的氯离子，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试样中的氯含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

10.1 氢氧化钠（NaOH）。

10.2 铬酸钾（K_2CrO_4）。

10.3 氯化钠标准品（NaCl）：纯度≥99 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.4 硝酸银（$AgNO_3$）。

10.5 三氯乙酸溶液（500 g/L）：称取 500 g 三氯乙酸溶入 1000 mL 水中。

10.6 氢氧化钠溶液（50 g/L）：称取 25g 氢氧化钠溶入 500 mL 水中。

10.7 硝酸溶液（0.1 mol/L）：吸取 6 mL 硝酸，用水稀释至 1000 mL。

10.8 铬酸钾溶液（50 g/L）：称取 5 g 铬酸钾溶于 100 mL 水中。

10.9 氯化钠标准溶液（0.1 mol/L）：称取经 500 ℃±50 ℃烘至恒重的氯化钠标准品 5.8440 g 于 1000 mL 容量瓶中，用去离子水溶解并定容。

10.10 硝酸银溶液（0.05 mol/L）：称取 8.50 g（精确至 0.01 g）硝酸银标准品（10.4），于 100 mL 烧杯中，用少量水溶解后转移到 1000 mL 容量瓶中，用水定容，摇匀，避光贮存，或转移到棕色容量瓶中。

取 10 mL 氯化钠标准溶液（10.9）于 125 mL 容量瓶中，加 10 滴铬酸钾溶液（10.8），用上述硝酸银溶液滴定，根据消耗的硝酸银溶液体积，按（4）式计算硝酸银溶液的实际浓度。

$$c = \frac{0.1 \times 10}{V} \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

c——硝酸银溶液的实际浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V——硝酸银溶液的体积，单位为毫升（mL）；

0.1——氯化钠标准溶液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

10——氯化钠标准溶液的体积，单位为毫升（mL）。

10.11 酚酞乙醇指示剂（10 g/L）：称取 1 g 酚酞溶于 100 mL 乙醇（95 %）中。

11 仪器和设备

11.1 天平：感量为 0.1 mg。

11.2 容量瓶：100 mL。

11.3 三角瓶：125 mL。

11.4 棕色滴定管：10 mL。

12 分析步骤

12.1 称取混合均匀的试样 10 g（精确至 0.0001 g）于小烧杯中，加 50 mL 水溶解后移入 100 mL 容量瓶中，加三氯乙酸溶液（10.5）10 mL 混匀定容，静置约 1 min 后过滤。

12.2 吸取滤液 10 mL 于 125 mL 三角瓶中，加三滴酚酞指示剂（10.11），用氢氧化钠溶液（10.6）调节至微红色。用硝酸溶液（10.7）回调至红色刚好退去。再加 10 滴铬酸钾溶液（10.8）后用硝酸银溶液（10.10）滴定至桔红色 1 min 内不褪色，即为终点，滴定时在底端放一白色纸，更易于辨认终点。同时做空白试验。

13 分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

试样中氯的含量按式（5）计算：

$$X_2 = (V_3 - V_4) \times c_3 \times 35.5 \times \frac{V_5}{V_6} \times \frac{100}{m_2} \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

X_2——试样中氯的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

V_3——滴定样液所消耗的硝酸银溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_4——空白液所消耗的硝酸银溶液的体积，单位为毫升（mL）；

c_3——硝酸银溶液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_5——样液体积，单位为毫升（mL）；

V_6——吸取滤液体积，单位为毫升（mL）；

m_2——样品的质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过算术平均值的5 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.25—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 5413.25-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 肌醇的测定》。

本标准与GB/T 5413.25-1997相比，第一法主要变化如下：

——对菌种保藏培养基进行了纠正；

——试样处理由盐酸蒸馏法改为盐酸高压水解法；

——菌种接种方式由菌液与培养基混合后分装试管改为菌液向试管中滴加法；

——对标准工作溶液的浓度做了调整；

——灭菌温度由100 ℃调整为121 ℃；

——明确了控制接种菌悬液浓度的要求和方法；

——提高了计算公式的适用性；

——增加了检出限。

第二法主要变化如下：

——采用肌醇硅烷化衍生法；

——增加了检出限。

本标准的附录A和附录B为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.25-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 微生物法

3 原理

利用葡萄汁酵母菌（*Saccharomyces uvarum*）对肌醇的特异性和灵敏性，定量测定出试样中待测物质的含量。在含有除待测物质以外所有营养成分的培养基中，微生物的生长与待测物质含量呈线性关系，根据透光率与标准工作曲线进行比较，即可计算出试样中待测物质的含量。

4 试剂和材料

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

4.1 菌株：葡萄汁酵母菌（*Saccharomyces uvarum*），ATCC 9080。

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

4.3 氯化钠（NaCl）。

4.4 氢氧化钠（NaOH）。

4.5 培养基

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

4.5.2 肌醇测定培养基：参见附录 A。

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

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

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

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

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.11　肌醇标准溶液

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

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

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

4.12　干燥剂：五氧化二磷（P_2O_5）。

4.13　玻璃珠：直径约 5 mm。

5　仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

5.1　天平：感量为 0.1 mg。

5.2　pH 计：精度≤0.02。

5.3　分光光度计。

5.4　涡旋混合器。

5.5　离心机：转速≥2000 转/分钟。

5.6　恒温培养箱：30 ℃ ±1 ℃。

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

5.8　冰箱：2 ℃～5 ℃。

5.9　无菌吸管：10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器或吸头。

5.10　瓶口分液器：0 mL～10 mL。

5.11　锥形瓶：200 mL。

5.12　容量瓶（A 类）：100 mL ，250 mL， 500 mL。

5.13　单刻度移液管（A 类）：容量 5 mL。

5.14　漏斗：直径 90 mm。

5.15　定量滤纸：直径 90 mm。

5.16　试管：18 mm ×180 mm。

注：玻璃仪器使用前，用活性剂对硬玻璃测定管及其他必要的玻璃器皿进行清洗，清洗之后在 200 ℃干热 2 h。

6　分析步骤

6.1　接种菌悬液的制备

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.1.1 菌种复苏

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

6.1.2 接种菌悬液的制备

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

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

6.2 试样的处理

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

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

6.3 标准曲线的制作

按表 1 顺序加入蒸馏水、肌醇标准工作液（4.11.3）和肌醇测定培养基（4.5.2）于培养管中，一式三份。

表1 标准曲线的制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
蒸馏水（mL）	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
肌醇标准工作液 1 μg/mL（mL）	0	0	1	2	3	4	5	0	0	0
肌醇标准工作液 2 μg/mL（mL）	0	0	0	0	0	0	0	3	4	5
培养基（mL）	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

6.4 待测液的制作

按表 2 顺序加入蒸馏水、待测液（6.2.2）和肌醇测定培养基（4.5.2）于培养管中，一式三份。

表2 待测液的制作

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

6.5 灭菌

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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

6.6 接种

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

6.7 培养

将试管固定在振荡培养箱内，用约 140 次/min～160 次/min 的振荡速度，在 30 ℃ ±1 ℃振荡培养 22 h～24 h。

6.8 测定

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

6.8.1 从振荡培养箱内取出试管，放入灭菌釜内，100 ℃保持 5 min，使微生物停止生长。

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

6.8.3 用涡旋混合器充分混合每一支试管（也可以加一滴消泡剂）后，立即将培养液移入比色皿内进行测定，波长为 540 nm～660 nm，待读数稳定 30 s 后，读出透光率，每支试管稳定时间要相同。以肌醇标准品的含量为横坐标，透光率为纵坐标作标准曲线。

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

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

注： 绘制标准曲线，既可读取透光率（T %），也可读取吸光度（A）。

7 分析结果的表述

试样中肌醇的含量按式(1)计算：

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

式中：

X——试样中肌醇的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

C_x——6.8.5 中计算所得的总平均值，单位为微克（μg）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

f ——稀释倍数。婴幼儿食品和乳品 f 为 250。

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

8 精密度

食品伙伴网http://www.foodmate.net

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

第二法 气相色谱法

9 原理

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

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 无水乙醇(C_2H_6O)。

10.2 正己烷(C_6H_{14})。

10.3 乙醇（95 %）。

10.4 乙醇（70 %）。

10.5 三甲基氯硅烷(C_3H_9ClSi)。

10.6 六甲基二硅胺烷($C_6H_{19}NSi_2$)。

10.7 N，N-二甲基甲酰胺(C_3H_7NO)。

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

10.9 肌醇标准品：纯度≥99 %。

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

11 仪器和设备

11.1 天平：感量为 0.1 mg。

11.2 气相色谱仪，带 FID 检测器。

11.3 离心机：转速≥5000 转/分钟。

11.4 旋转蒸发仪。

11.5 超声波清洗器。

11.6 恒温热水浴槽。

11.7 带有罗纹盖的 25 mL 试管。

12 分析步骤

食品伙伴网http://www.foodmate.net

12.1 试样处理与衍生

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

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

12.2 标准测定液的制备

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

12.3 测定

12.3.1 参考色谱条件

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

进样口温度：280 ℃。

检测器温度：300 ℃。

分流比：10：1。

进样量：1.0 μL。

程序升温见表 3：

表 3 程序升温

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

12.3.2 标准曲线制作

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

12.3.3 试样溶液的测定

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

13 分析结果的表述

试样中肌醇含量按式(2)计算：

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

式中：

X——试样中肌醇含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

C_s——从标准曲线中获得试样测定液肌醇的含量，单位为毫克（mg）。

m_i——试样的质量，单位为克（g）。

f_i——试样测定液所含肌醇换算成试样中所含肌醇的系数为 10。

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

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

15 其他

本标准第一法、第二法检出限均为 2.0 mg/100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 麦芽浸粉琼脂培养基（Malt Extract Agar）

A.1.1 成分

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

A.1.2 制法

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

A.2 肌醇测定培养基

A.2.1 成分

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

A.2.2 制法

将上述成分溶解于水中，调节 pH，备用。

注：一些商品化合成培养基效果良好，商品化合成培养基按标签说明进行配制。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（资料性附录）
肌醇标准衍生物气相色谱图

B.1 肌醇标准衍生物气相色谱图

肌醇标准衍生物气相色谱图 B.1。

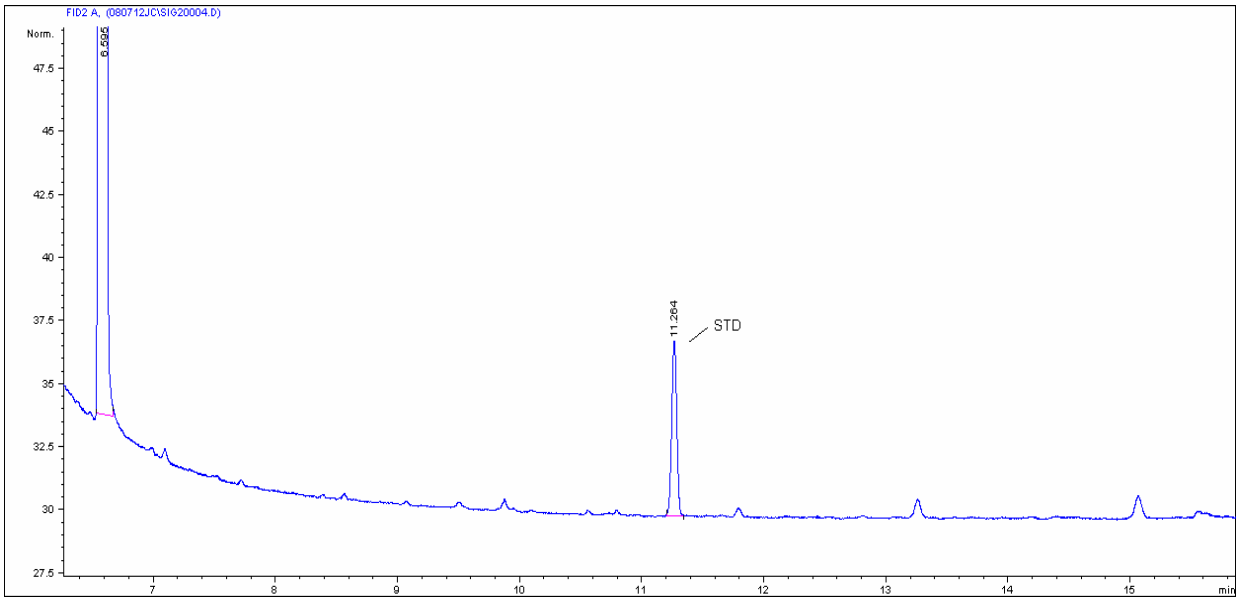


图 B.1 肌醇标准品衍生物气相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.26—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准第二法等同采用国际分析家学会（AOAC）AOAC 997.05 Taurine in powdered milk and powdered infant formulae。

本标准代替GB/T 5413.26-1997《婴幼儿食品和乳粉 牛磺酸的测定》。

本标准与GB/T 5413.26-1997相比，主要变化如下：

——将原标准方法OPA柱后衍生高效液相色谱法定为第一法；

——增加单磺酰氯柱前衍生高效液相色谱法为第二法；

——对原标准的结构进行了修改。

——外标法定量采用标准曲线法；

——增加附录 A 标样的液相色谱图。

本标准附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.26-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 OPA 柱后衍生法

3 原理

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，与邻苯二甲醛（OPA）衍生反应，用荧光检测器进行检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 偏磷酸（HPO_3）。

4.2 柠檬酸三钠($Na_3C_6H_5O_7·2H_2O$)。

4.3 苯酚(C_6H_6O)。

4.4 硝酸(HNO_3)。

4.5 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

4.6 硼酸(H_3BO_3)。

4.7 氢氧化钾(KOH)。

4.8 邻苯二甲醛($C_8H_6O_2$)（OPA）。

4.9 2-巯基乙醇(C_2H_6OS)。

4.10 聚氧乙烯月桂酸醚（Brij-35）。

4.11 牛磺酸标准品：纯度≥99%。

4.12 偏磷酸溶液（10 g/L）：称取 10.0 g 偏磷酸（4.1），用水溶解并定容至 1000 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.13　柠檬酸缓冲液：称取 19.6 g 柠檬酸三钠（4.2），加 950 mL 水溶解，加入 1 mL 苯酚（4.3），用硝酸（4.4）调 pH 值至 3.10～3.25，经 0.45μm 微孔滤膜过滤。

4.14　柱后荧光衍生溶剂（邻苯二甲醛溶液）

4.14.1　硼酸钾溶液（0.5 mol/L）：称取 30.9 g 硼酸（4.6），26.3 g 氢氧化钾（4.7），用水溶解并定容至 1000 mL。

4.14.2　邻苯二甲醛衍生溶液：称取 0.60 g 邻苯二甲醛（4.8），用 10 mL 甲醇（4.5）溶解后，加入 0.5 mL 2-巯基乙醇（4.9）和 0.35 g Brij-35（4.10），用 0.5 mol/L 的硼酸钾溶液（4.14.1）定容至 1000 mL，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。临用前配制。

4.15　牛磺酸标准溶液

4.15.1　牛磺酸标准储备溶液（1mg/mL）：准确称取 0.1000 g 牛磺酸标准品（4.11），用水溶解并定容至 100 mL。储备液在 4℃下可保存 7 天。

4.15.2　牛磺酸标准工作液：将牛磺酸标准储备液（4.15.1）用水稀释制备一系列标准溶液，标准系列浓度为：0、5、10、15、20 μg/mL。临用前配制。

5　仪器和设备

5.1　高效液相色谱仪，带有荧光检测器。

5.2　柱后反应器。

5.3　荧光衍生溶剂输液泵。

5.4　超声波振荡器。

5.5　pH 计：精度为 0.01。

5.6　离心机：转速≥5000 转/分钟。

5.7　0.45 μm 微孔滤膜。

5.8　天平：感量为 1mg，0.1mg。

6　分析步骤

6.1　试样的处理

准确称取固体样品 1 g～5 g 试样，液体样品 5 g～20 g（精确至 0.01g，试样中含牛磺酸 5 μg 以上），加 30 mL 偏磷酸溶液（4.12）溶解，充分摇匀，移入 100 mL 容量瓶中；放入超声波振荡器中振荡 10 min～15 min，取出冷却至室温后，用水定容至刻度；样液在 5000 转/分钟条件下离心 10 min，取上清液经 0.45 μm 微孔膜（5.7）过滤，接取中间滤液以备进样。

6.2　测定

6.2.1　参考色谱条件

色谱柱：钠离子氨基酸分析专用柱（250 mm×4.6 mm）或同等性能的色谱柱。

流动相：柠檬酸缓冲液（4.13）。

流动相流速：0.30 mL/min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

荧光衍生溶剂流速：0.30 mL/min。

柱温：55 ℃。

检测波长：激发波长：338 nm，发射波长：425 nm。

进样量：20 μL。

6.2.2 标准曲线绘制

将牛磺酸标准系列工作液（4.15.2）依次经衍生后按上述推荐色谱条件上机测定，记录色谱峰面积，色谱图参见附录 A。以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.2.3 试液测定

将试液按上述推荐色谱条件上机测定，从标准曲线中查得试液相应的浓度。

7 分析结果的表述

7.1 结果计算

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X ——试样中牛磺酸的含量，单位为毫克/100 克（mg/100g）；

c ——试液的进样浓度，单位为微克/毫升（μg/mL）；

V——试样定容容积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）。

7.2 结果表示

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

第二法 单磺酰氯柱前衍生法

9 原理

样品用水溶解，用亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白质。取上清液用丹磺酰氯衍生反应，衍生物经 C_{18} 反相色谱柱分离，用紫外检测器（波长 254 nm）或荧光检测器（激发波长 330 nm，发射波长 530 nm）检测，外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

10.2 冰乙酸（CH_3COOH）。

10.3 盐酸。

10.4 无水碳酸钠（Na_2CO_3）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.5　亚铁氰化钾[$K_4Fe(CN)_6$]。

10.6　乙酸锌[$Zn(CH_3COO)_2$]。

10.7　乙酸钠[$Na(CH_3COO)$]。

10.8　盐酸甲胺（甲胺盐酸盐）（$CH_3NH_2 \cdot HCl$）。

10.9　丹磺酰氯（5-二甲氨基萘-1-磺酰氯）：色谱纯。

注：丹磺酰氯对光和湿敏感不稳定。

10.10　牛磺酸标准品：纯度≥99%。

10.11　盐酸（1 mol/L）：吸取 9 mL 盐酸（10.3），用水稀释并定容到 100 mL。

10.12　沉淀剂

10.12.1　沉淀剂Ⅰ：称取 15.0 g 亚铁氰化钾（10.5），用水溶解并定容至 100 mL。该沉淀剂在室温下 3 个月内稳定。

10.12.2　沉淀剂Ⅱ：称取 30.0 g 乙酸锌（10.6），用水溶解并定容至 100 mL。该沉淀剂在室温下 3 个月内保持稳定。

10.13　碳酸钠缓冲液（pH 9.5）（80 mmol/L）：称取 0.424 g 无水碳酸钠（10.4），加 40 mL 水溶解，用 1 mol/L 盐酸（10.11）调 pH 值至 9.5，用水定容至 50 mL。该溶液在室温下 3 个月内稳定。

10.14　丹磺酰氯溶液（1.5 mg/mL）：称取 0.15 g 丹磺酰氯（10.9），用乙腈（10.1）溶解并定容至 100mL。临使用前配制。

10.15　盐酸甲胺溶液（20 mg/mL）：称取 2.0 g 盐酸甲胺（10.8），用水溶解并定容至 100 mL。该溶液在 4℃下 3 个月内稳定。

10.16　乙酸钠缓冲液（pH4.2）（10 mmol/L）：称取 0.820 g 乙酸钠（10.7），加 800 mL 水溶解，用冰乙酸（10.2）调节 pH 值至 4.2，用水定容至 1000 mL，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

10.17　牛磺酸标准溶液

10.17.1　牛磺酸标准储备溶液（1 mg/mL）：称取 0.1000 g 牛磺酸标准品（10.10），用水溶解并定容至 100 mL。储备液在 4℃下可保存 7 天。

10.17.2　牛磺酸标准工作液（紫外检测用）：将牛磺酸标准储备液（10.17.1）用水稀释制备一系列标准溶液，标准系列浓度为：0、5、10、15、20 μg/mL。临用前配制。

10.17.3　牛磺酸标准工作液（荧光检测用）：将牛磺酸标准储备液（10.17.2）用水稀释制备一系列标准溶液，标准系列浓度为：0、0.5、0.10、0.15、0.20 μg/mL。临用前配制。

11　仪器和设备

11.1　高效液相色谱仪，带紫外检测器或二极管阵列检测器或者荧光检测器。

11.2　pH 计：精度为 0.01。

11.3　涡旋混合器。

11.4　超声波振荡器。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

11.5　离心机：转速≥5000 转/分钟。

11.6　0.45 μm 微孔滤膜。

11.7　天平：感量 1mg，0.1mg。

12　操作步骤

12.1　试样的处理

12.1.1　试液提取

称取固体样品 1 g～5 g，液体样品 5 g～30 g 试样（精确至 0.01 g，若用紫外检测器，试样中含牛磺酸宜在 1 μg 以上，若用荧光检测器，试样中含牛磺酸宜在 50μg 以上）于 100 mL 容量瓶中，加入 80 mL 温水（50 ℃～60 ℃）溶解，充分混匀，置超声波振荡器上振荡 10 min，冷却到室温。加 1.0 mL 沉淀剂Ⅰ（10.12.1），涡旋混合，1.0 mL 沉淀剂Ⅱ（10.12.2），涡旋混合，用水定容至刻度，充分混匀，试液于 5000 转/分钟下离心 10 min，取上清液备用。上清液在 4 ℃ 暗处保存放置 24 h 稳定。

12.1.2　试液衍生化

吸取 1.00 mL 上述上清液到 10 mL 具塞玻璃试管中，加入 1.00 mL 碳酸钠缓冲液（10.13），1.00 mL 丹磺酰氯溶液（10.14），充分混合，室温避光衍生反应 2 h（1 h 后需摇晃 1 次），加入 0.10 mL 盐酸甲胺溶液（10.15）涡旋混合，以终止反应，避光静置至沉淀完全。取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜（11.6）过滤，取滤液备用。衍生物在 4 ℃可避光保存 48 h。

另取 1.00 mL 标准工作液（10.17.2），与试液同步进行衍生。

12.2　测定

12.2.1　参考色谱条件

色谱柱：C_{18} 反相色谱柱（粒径 5 μm，250 mm×4.6 mm）或同等性能色谱柱。

流动相：10 mmol/L 乙酸钠缓冲液（10.16）—乙腈（10.1）＝70+30。

流速：1.00 mL/min。

柱温：室温。

检测波长：紫外检测器或二极管阵列检测器：254 nm；

或荧光检测器：激发波长：330 nm；发射波长：530 nm。

进样量：20 μL。

12.2.2　标准曲线绘制

将牛磺酸标准系列工作液（紫外检测用）（10.17.2）或牛磺酸标准系列工作液（荧光检测用）（10.17.3）的衍生物依次按上述推荐色谱条件上机测定，记录色谱峰面积，色谱图参见附录 A。以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

12.2.3　试液测定

将试液衍生物按上述推荐色谱条件上机测定，从标准曲线中查得试液相应的浓度。

13　分析结果的表述

试样中牛磺酸的含量按式（2）计算：

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中牛磺酸的含量，单位为毫克/100 克（mg/100g）；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

c——试液的进样浓度，单位为微克/毫升（μg/mL）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）。

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

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

15 其他

本标准的定量限为：当取样量为 10.00 g 时，第一法 0.5 mg/100g ，第二法中紫外检测法为 5 mg/100g，荧光检测法为 0.1 mg /100 g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
标准溶液液相色谱图

A.1 标准溶液液相色谱图

邻苯二甲醛（OPA）柱后衍生法液相色谱图参见图 A.1。
单磺酰氯柱前衍生法液相色谱图（紫外检测）参见图 A.2。
单磺酰氯柱前衍生法液相色谱图（荧光检测）参见图 A.3。

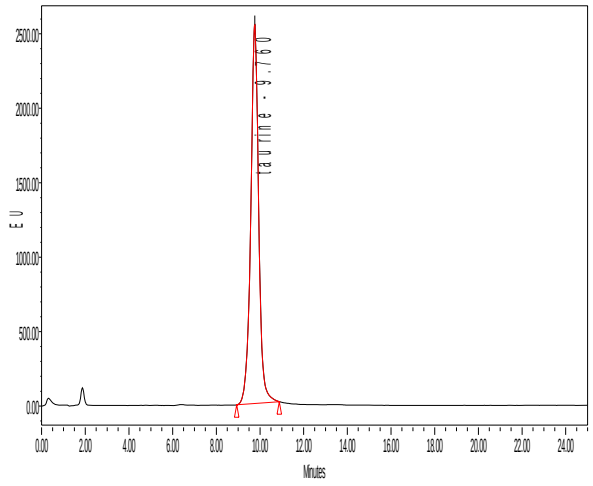


图 A.1　邻苯二甲醛（OPA）柱后衍生法液相色谱图

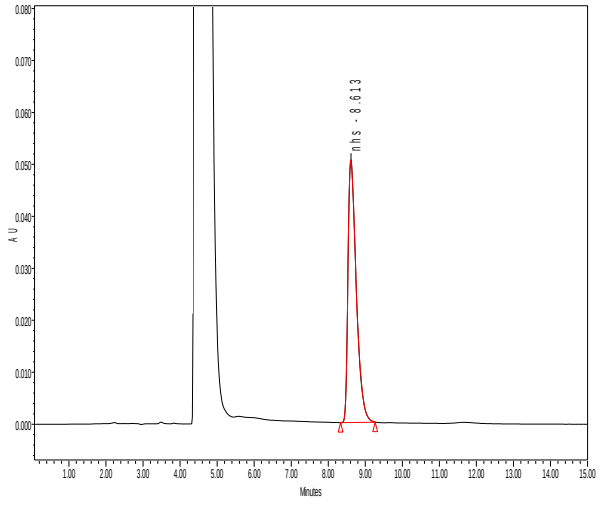


图 A.2　单磺酰氯柱前衍生法液相色谱图（紫外检测）

食品伙伴网http://www.foodmate.net

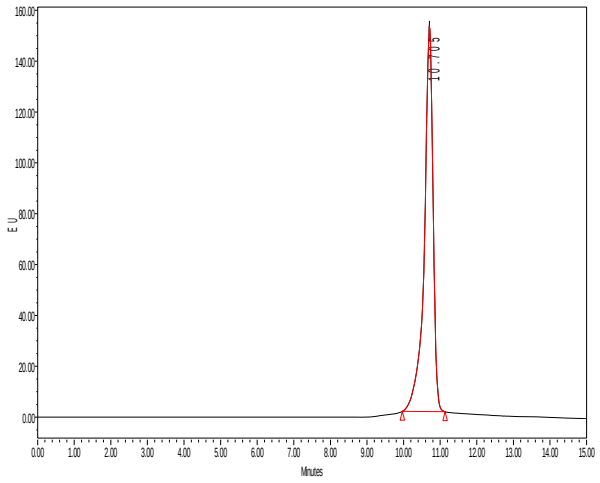


图 A.3　单磺酰氯柱前衍生法液相色谱图（荧光检测）

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.27—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定

National food safety standard

Determination of fatty acids in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB/T 21676-2008 《乳与乳制品 脂肪酸的测定 气相液相色谱法》、GB/T 5413.27-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 DHA、EPA的测定》、GB/T 5413.4-1997 《婴幼儿配方食品和乳粉 亚油酸的测定》。

本标准与原标准相比，主要变化如下：

——第一法为乙酰氯—甲醇甲酯化法；

——将GB/T 21676-2008、GB/T 5413.27-1997、GB/T 5413.4-1997合并为本标准第二法氨水—乙醇提取法。

本标准中附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5413.4-1997；

——GB/T 5413.27-1997；

——GB/T 21676-2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定，第二法不适用于含有被包埋脂肪酸的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 乙酰氯—甲醇甲酯化法

3 原理

乙酰氯与甲醇反应得到的盐酸—甲醇使试样中的脂肪和游离脂肪酸甲酯化，用甲苯提取后，经气相色谱仪分离检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 无水碳酸钠。

4.2 甲苯：色谱纯。

4.3 乙酰氯。

4.4 乙酰氯甲醇溶液（体积分数为 10 %）：量取 40 mL 甲醇于 100 mL 干燥的烧杯中，准确吸取 5.0 mL 乙酰氯（4.3）逐滴缓慢加入，不断搅拌，冷却后转移并定容至 50 mL 干燥的容量瓶中。临用前配制。

注：乙酰氯为刺激性试剂，配制乙酰氯甲醇溶液时应不断搅拌防止喷溅，注意防护。

4.5 碳酸钠溶液：准确称取 6 g 无水碳酸钠（4.1）于 100 mL 烧杯中，加水溶解，转移并用水定容至 100 mL 容量瓶中。

4.6 脂肪酸甘油三酯标准品：纯度≥99 %，脂肪酸种类参见附录 A 中的表 A.1。

4.7 脂肪酸甘油三酯标准工作液：按试样中各脂肪酸含量及所要分析脂肪酸的种类配制适当浓度的标准工作液，用甲苯定容并分别保存于－10 ℃以下的冰箱中，有效期三个月。

5 仪器和设备

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

5.2 恒温热水浴槽。

5.3 离心机：转速≥5000 转/分钟。

5.4 气相色谱仪，带 FID 检测器。

5.5 冷冻干燥仪。

5.6 氮吹仪。

5.7 螺口玻璃管（带有聚四氟乙烯做内垫的螺口盖）：15 mL。

5.8 离心管：50mL。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 试样含水量大于 5 %时，冷冻干燥至含水量小于 5 %。

6.1.2 称取试样 0.5 g（精确到 0.1 mg）于 15 mL 干燥螺口玻璃管（5.7）中，加入 5.0 mL 甲苯（4.2）。

6.1.3 称取无水奶油试样 0.2 g（精确到 0.1 mg）于 15 mL 干燥螺口玻璃管（5.7）中，加入 5.0 mL 甲苯（4.2）。

6.2 甲酯化提取

6.2.1 试样测定液的制备

在试样（6.1.2或6.1.3）中加入10 %乙酰氯甲醇溶液6.0 mL（4.4），充氮气后，旋紧螺旋盖，振荡混合后于80 ℃ ±1 ℃水浴中放置2 h，期间每隔20 min取出振摇一次，水浴后取出冷却至室温。将反应后的样液转移至50 mL离心管中，分别用3.0 mL碳酸钠溶液（4.5）清洗玻璃管三次，合并碳酸钠溶液（4.5）于50 mL离心管（5.8）中，混匀，5000 转/分钟离心约5 min。取上清液作为试液，气相色谱仪测定。

6.2.2 标准测定液的制备

准确吸取脂肪酸甘油三酯标准工作液（4.7）0.5 mL于15 mL螺口玻璃管（5.7）中，加入4.5 mL甲苯，其他操作步骤同6.2.1。

6.3 色谱参考条件

色谱柱：固定液100 %二氰丙基聚硅氧烷，100 m ×0.25 mm，0.20 μm，或性能相当的色谱柱。

载气：氮气。

载气流速：1.0 mL/min。

进样口温度：260 ℃。

分流比：30：1。

检测器温度：280 ℃。

柱温箱温度：初始温度140 ℃，保持5 min，以4 ℃/min升温至240 ℃，保持15 min。

进样量：1.0 μL。

6.4 试样溶液的测定

食品伙伴网http://www.foodmate.net

分别准确吸取1.0 μL脂肪酸标准测定液（6.2.2）及试样测定液（6.2.1）注入色谱仪，平行测定次数不少于两次，以色谱峰峰面积定量。

7 分析结果的表述

7.1 试样中各脂肪酸的含量的计算

试样中各脂肪酸的含量按公式（1）计算：

$$X_i = \frac{A_{si} \times m_{stdi} \times F_j}{A_{stdi} \times m} \times 100 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_i—— 试样中各脂肪酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

A_{si}—— 试样测定液中各脂肪酸的峰面积；

m_{stdi}——在标准测定液的制备（6.2.2）中吸取的脂肪酸甘油三酯标准工作液中所含有的标准品的质量, 单位为毫克（mg）；

F_j——各脂肪酸甘油三酯转化为脂肪酸的换算系数，参见附录 A 中的表 A.1；

A_{stdi}——标准测定液中各脂肪酸的峰面积；

m——试样的称样质量，单位为克（g）。

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

7.2 试样中总脂肪酸的含量计算

试样中总脂肪酸的含量按公式（2）计算：

$$X_{TotalFA} = \sum X_i \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

$X_{Total\ FA}$——试样中总脂肪酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

X_i——试样中各脂肪酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）。

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

7.3 试样中某个脂肪酸占总脂肪酸的百分比（%）的计算

试样中某个脂肪酸占总脂肪酸的百分比（%）Y 按公式（3）计算：

$$Y = \frac{X_i}{X_{TotalFA}} \times 100 \text{ 或 } \quad Y = \frac{A_{si} \times F_j}{\sum A_{si} \times F_j} \times 100 \quad \cdots\cdots (3)$$

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

本方法最低检出限参见附录A中的表A.1。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

第二法 氨水—乙醇提取法

10 原理

乳与乳制品中的脂肪经皂化处理后生成游离脂肪酸，在三氟化硼催化下进行甲酯化反应，经甲酯化后的脂肪酸通过气相色谱柱分离，以氢火焰离子化检测器检测，外标法定量。

11 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的一级水。

11.1 甲醇：色谱纯。

11.2 乙醚。

11.3 石油醚：沸程 30 ℃～60 ℃。

11.4 乙醇（体积分数≥95 %）。

11.5 氨水（体积分数为 25 %）。

11.6 正己烷（C_6H_{14}）：色谱纯。

11.7 高峰氏淀粉酶（Taka-Diastase）：128 U/mg。

11.8 三氟化硼甲醇溶液（质量分数为 14 %）。

11.9 饱和氯化钠溶液：溶解 360 g 氯化钠于 1.0 L 水中，搅拌溶解，澄清备用。

11.10 氢氧化钾甲醇溶液（0.5 mol/L）：称取 2.8 g 氢氧化钾，用甲醇（11.1）溶解，并稀释定容至 100 mL，混匀。

11.11 焦性没食子酸甲醇溶液（10 %）：将 1.0 g 焦性没食子酸溶于 10 mL 甲醇中配制成 10 %焦性没食子酸甲醇溶液备用。

11.12 脂肪酸甲酯标准物质：纯度≥99 %，贮存于－10 ℃以下的冰箱中，脂肪酸种类参见附录 A 中的表 A.1。

11.13 脂肪酸甲酯标准工作溶液：按试样中各脂肪酸含量及所要分析脂肪酸的种类适当配制其浓度，正己烷定容并贮存于－10 ℃以下的冰箱中，有效期三个月。

12 仪器和设备

12.1 天平：感量为 0.1 mg。

12.2 抽脂管：100 mL 磨口具塞试管，抽脂管干燥、恒重。

12.3 旋转蒸发仪。

12.4 离心机：转速≥5000 转/分钟。

12.5 恒温水浴锅。

12.6 气相色谱仪，带 FID 检测器。

13 分析步骤

食品伙伴网http://www.foodmate.net

13.1 试样制备

预先将需冷藏的试样从冰箱中取出，放至室温。

13.1.1 液态试样

称取10 g（精确到0.1 mg）试样于抽脂管中，待测。

13.1.2 固态试样

13.1.2.1 含淀粉试样

称取试样 1.0 g（精确到 0.1 mg）至抽脂管中（12.2），加入 0.1 g 高峰氏淀粉酶（11.7），加入 10 mL 45 ℃～50 ℃的水，混合均匀后，用氮气排除瓶中空气，盖上瓶塞，置 45 ℃ ±1 ℃烘箱内 30 min，取出。

13.1.2.2 不含淀粉试样

称取试样 1.0 g（精确到 0.1 mg）至抽脂管（12.2）中，加入 65 ℃ ±1 ℃的水 10 mL 溶解试样，振摇，使样品完全分散。

于上述试样（13.1.1和13.1.2）中加入2 mL氨水（11.5），于65 ℃ ±1 ℃水浴锅中放置15 min，取出轻摇，冷至室温。

13.1.3 无水奶油

称取试样0.2 g（精确到0.1 mg）于磨口烧瓶中，按13.3所述进行皂化酯化。

13.2 脂肪提取

在制备好的样品中加入10 mL乙醇（11.4），混匀。加入25 mL乙醚（11.2），加塞振摇1 min。加入25 mL石油醚（11.3），加塞振摇1 min，静置、分层，有机层转入磨口烧瓶中。再加入25 mL乙醚（11.2）及25 mL石油醚（11.3），加塞振摇1 min，静置、分层，有机层转入磨口烧瓶中，再重复操作一次。合并抽提液于磨口烧瓶中，用旋转蒸发仪浓缩至干。

13.3 皂化酯化

在浓缩物（13.2）或无水奶油（13.1.3）中加入1.0 mL焦性没食子酸甲醇溶液（11.11）。浓缩干燥之后再加入10 mL氢氧化钾甲醇溶液（11.10）置于80 ℃ ±1 ℃水浴上回流5 min～10 min。再加入5 mL三氟化硼甲醇溶液（11.8），继续回流15 min，冷却至室温，将烧瓶中的液体移入50 mL离心管中，分别用3 mL饱和氯化钠溶液（11.9）清洗烧瓶三次，合并饱和氯化钠溶液于50 mL离心管，加入10 mL正己烷（11.6），振摇后，以5000 转/分钟离心5 min，取上清液作为试液，供气相色谱仪（12.6）测定。

注：三氟化硼甲醇溶液为强腐蚀性试剂，使用时应注意防护。

13.4 色谱参考条件

色谱柱：固定液100 %二氰丙基聚硅氧烷，100 m ×0.25 mm，0.20 μm，或性能相当的色谱柱。

载气：氮气。

载气流速：1.0 mL/min。

进样口温度：260 ℃。

分流比：30：1。

检测器温度：280 ℃。

柱温箱温度：初始温度140 ℃，保持5 min，以4 ℃/min升温至240 ℃，保持15 min。

进样量：1.0 μL。

13.5 测定

食品伙伴网http://www.foodmate.net

分别准确吸取1.0 μL脂肪酸甲酯标准工作溶液（11.13）及试液（13.3）注入色谱仪，平行测定次数不少于两次，以色谱峰峰面积定量。

14 分析结果的表述

14.1 试样中各脂肪酸含量计算

试样中各脂肪酸的含量按公式（4）计算：

$$X_i = \frac{A_{si} \times C_{stdi} \times V \times F_i}{A_{stdi} \times m} \times 100 \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

X_i ——试样中各脂肪酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

A_{si}——试样溶液中各脂肪酸甲酯的峰面积；

C_{stdi}——脂肪酸甲酯标准工作液中各脂肪酸甲酯的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V——13.3中加入正己烷的体积：单位为毫升（mL）；

A_{stdi}——混合标准工作液中各脂肪酸甲酯的峰面积；

F_i ——各脂肪酸甲酯转化为脂肪酸的换算系数，参见附录A中的表A.1；

m ——试样的称样量，单位为克（g）。

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

14.2 试样中总脂肪酸的含量计算

试样中总脂肪酸的含量按公式（5）计算：

$$X_{TotalFA} = \sum X_i \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

$X_{Total\ FA}$——试样中总脂肪酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

X_i ——试样中各脂肪酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

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

14.3 试样中某个脂肪酸占总脂肪酸的百分比（%）的计算

试样中某个脂肪酸占总脂肪酸的百分比（%）Y 按公式（6）计算：

$$Y = \frac{X_i}{X_{TotalFA}} \times 100 \quad 或 Y = \frac{A_{si} \times F_i}{\sum A_{si} \times F_i} \times 100 \quad \cdots\cdots (6)$$

15 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15 %。

16 其他

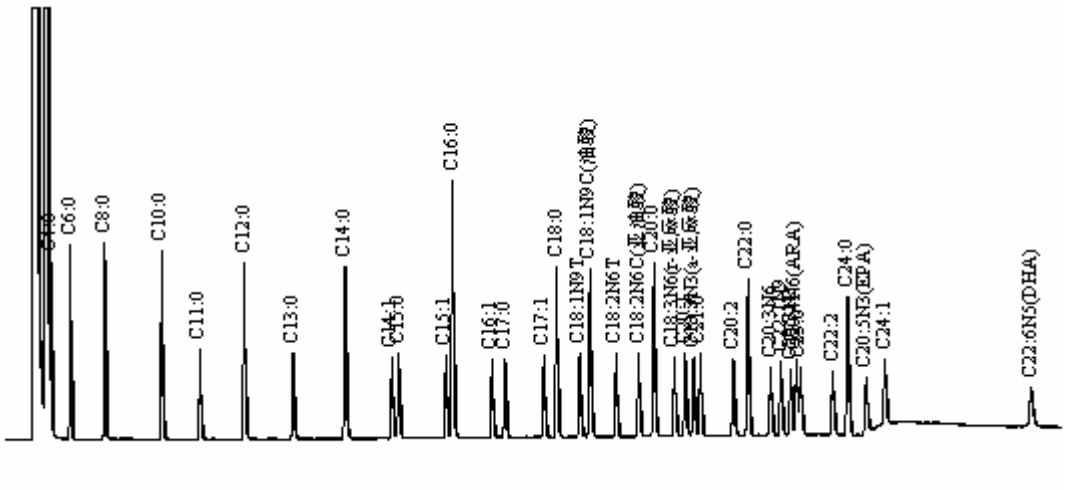
本方法检出限参见附录A中的表A.1。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（资料性附录）
脂肪酸的典型气相色谱图及换算系数

A.1 37种脂肪酸标准溶液典型图谱

37种脂肪酸标准溶液典型图谱见图A.1。



注：不同的色谱柱可能导致各种脂肪酸出峰时间不同，应以实验室单标校正的出峰顺序为准

图 A.1　37种脂肪酸标准溶液典型气相色谱图

A.2 各脂肪酸种类、检出限及脂肪酸甲酯或脂肪酸甘油三酯转化为脂肪酸的换算系数一览表

各脂肪酸种类、检出限及脂肪酸甲酯或脂肪酸甘油三酯转化为脂肪酸的换算系数一览表见表A.1。

表A.1 各脂肪酸种类、检出限及脂肪酸甲酯或脂肪酸甘油三酯转化为脂肪酸的换算系数一览表

序号	脂肪酸名称	检出限（mg/100 g）	F_i转换系数	F_j转换系数
1	丁酸 （C4:0）	0.5	0.8627	0.8742
2	己酸 （C6:0）	0.5	0.8923	0.9016
3	辛酸 （C8:0）	0.5	0.9114	0.9192
4	葵酸 （C10:0）	0.5	0.9247	0.9314
5	十一碳酸 （C11:0）	0.5	0.9300	0.9363
6	月桂酸 （C12:0）	0.5	0.9346	0.9405
7	十三碳酸 （C13:0）	0.5	0.9386	0.9442
8	肉豆蔻酸 （C14:0）	0.5	0.9421	0.9473
9	肉豆蔻油酸（C14:1n5）	0.5	0.9417	0.9470
10	十五碳酸 （C15:0）	0.5	0.9453	0.9502
11	十五碳一烯酸 （C15:1n5）	0.5	0.9449	0.9499
12	棕榈酸 （C16:0）	0.5	0.9481	0.9529
13	棕榈油酸 （C16:1n7）	0.5	0.9477	0.9525
14	十七碳酸 （C17:0）	0.5	0.9507	0.9552
15	十七碳一烯酸（ C17:1n7）	0.5	0.9503	0.9549
16	硬脂酸 （C18:0）	0.5	0.9530	0.9573
17	反式油酸 （C18:1n9t）	0.5	0.9527	0.9570

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表A.1（续）

序号	脂肪酸名称	检出限（mg/100 g）	F_i转换系数	F_j转换系数
18	油酸 （C18:1n9c）	0.5	0.9527	0.9571
19	反式亚油酸（C18: 2n6t）	0.5	0.9524	0.9568
20	亚油酸 （ C18: 2n6c）	0.5	0.9524	0.9568
21	花生酸 （ C20:0）	0.5	0.9570	0.9609
22	γ-亚麻酸 （ C18:3n6）	0.5	0.9520	0.9559
23	二十碳一烯酸（ C20:1）	0.5	0.9568	0.9608
24	α-亚麻酸 （ C18:3n3）	0.5	0.9520	0.9560
25	二十一碳酸（ C21:0）	0.5	0.9588	0.9628
26	二十碳二烯酸（ C20:2）	0.5	0.9565	0.9605
27	二十二碳酸（ C22:0）	0.5	0.9604	0.9642
28	二十碳三烯酸（ C20:3n6）	0.5	0.9562	0.9598
29	芥酸 （C22:1n9）	0.5	0.9602	0.9639
30	二十碳三烯酸 （ C20:3n3）	0.5	0.9562	0.9598
31	花生四烯酸 ARA（ C20:4n6）	0.5	0.9560	0.9597
32	二十三碳酸 （C23:0）	0.5	0.9620	0.9658
33	二十二碳二烯酸（ C22:2n6）	0.5	0.9600	0.9638
34	二十四碳酸 （C24:0）	0.5	0.9963	1.0002
35	二十碳五烯酸EPA （C20:5n3）	1.0	0.9557	0.9592
36	二十四碳一烯酸（C24:1n9）	1.0	0.9632	0.9666
37	二十二碳六烯酸甲酯 DHA（C22:6n3）	1.0	0.9590	0.9624

注1： F_i 是脂肪酸甲酯转换成脂肪酸的系数。

注 2：F_j 是脂肪酸甘油三酯转换成脂肪酸的系数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.29—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品溶解性的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准给出了两种方法。第一法为不溶度指数法，等同采用国际乳品联合会标准IDF129A:1988《乳粉和乳粉制品-不溶度指数的测定》；第二法为溶解度法。

本标准代替 GB/T 5413.29-1997《婴幼儿配方食品和乳粉 溶解性的测定》。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.29-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品溶解性的测定

1 范围

本标准规定了不溶度指数和溶解度的测定方法。

本标准第一法适用于不含大豆成分的乳粉的不溶度指数的测定，第二法适用于婴幼儿食品和乳粉的溶解度的测定。

第一法 不溶度指数的测定

2 术语和定义

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 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，静置一段时间后（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 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 硅酮消泡剂：硅酮乳化液的质量分数为 30 %。

按 6.4.5 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 0.01 mL。

5 仪器和设备

5.1 水浴锅：工作温度为 24.0 ℃±0.2 ℃或 50.0 ℃±0.2 ℃。

5.2 温度计：可测定温度为 24 ℃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 6.2、6.4.1 和 6.4.8 中所用温度计的准确度应符合规定。

5.3 称样容器：表面光滑的勺，或干净且光滑的取样纸。

5.4 天平：感量为 0.01g。

5.5 塑料量筒：容量为 100 mL±0.5 mL（20 ℃）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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：

a） 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。

注：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。

b） 叶片之间成 30º角，水平齿间距（叶轮的圆周）为 8.73 mm（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。

c） 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 10 mm±2 mm，也就是说杯的深度为 132 mm，由杯的顶部到叶片最低处是 122 mm±2 mm，杯顶部到叶片最高处为 115 mm±2 mm。叶轮应位于杯中央。

d） 当向搅拌杯中加入 100 mL24 ℃的水进行混合时，搅拌器接通后，叶轮的固定转速为 3600 转/分钟±100 转/分钟（在 5 s 之内达到）。叶轮的旋转方向应为顺时针（由图 1 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 3600 转/分钟±100 转/分钟（适用于不能保证转速准确度的搅拌器）。

5.8 玻璃搅拌杯：容量为 500 mL。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 s～60 s 和 0 min～60 min。

5.10 平勺：长度约 210 mm。

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 160 g_n，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 $1.12rn^2\times10^6$；r 为水平旋转的有效半径，mm；n 为转速，转/分钟。

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 0.1 mL 处：±0.05 mL；

——0.1 mL～1mL：±0.1mL；

——1 mL～2 mL：±0.2 mL；

——2 mL～5 mL：±0.3 mL；

——5 mL～10 mL：±0.5 mL；

——在 10 mL 处：±1 mL。

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。如果是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 250 mm，直径为 3.5 mm。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.15　放大镜：读取沉淀物体积数。

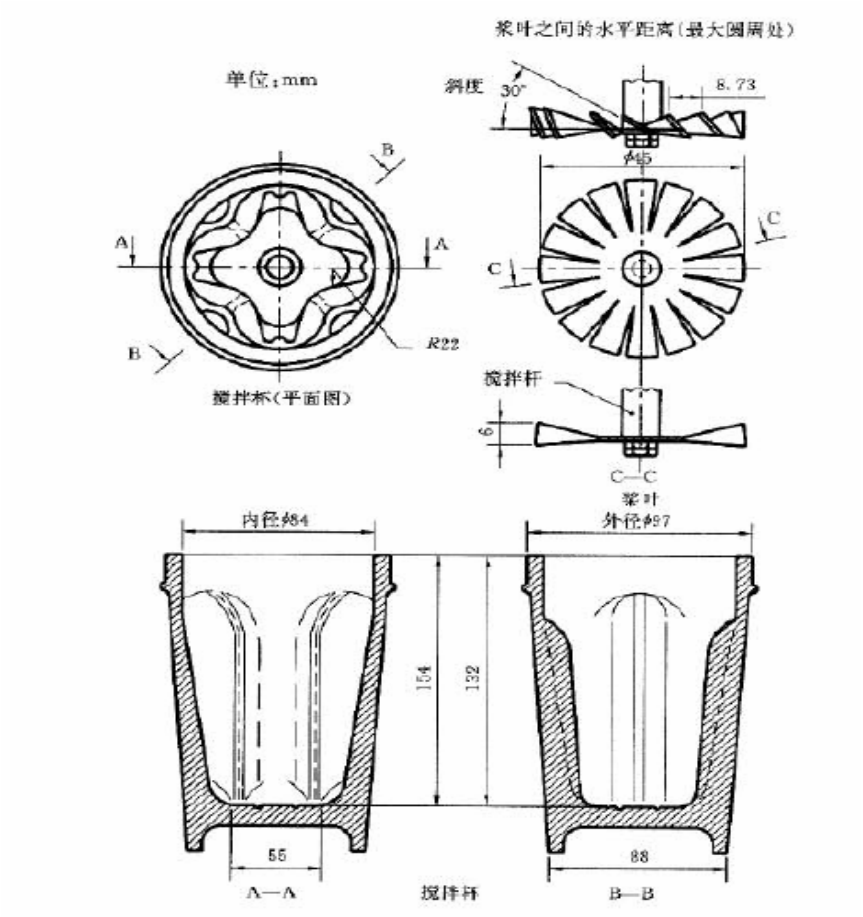


图 1 搅拌杯和搅拌浆

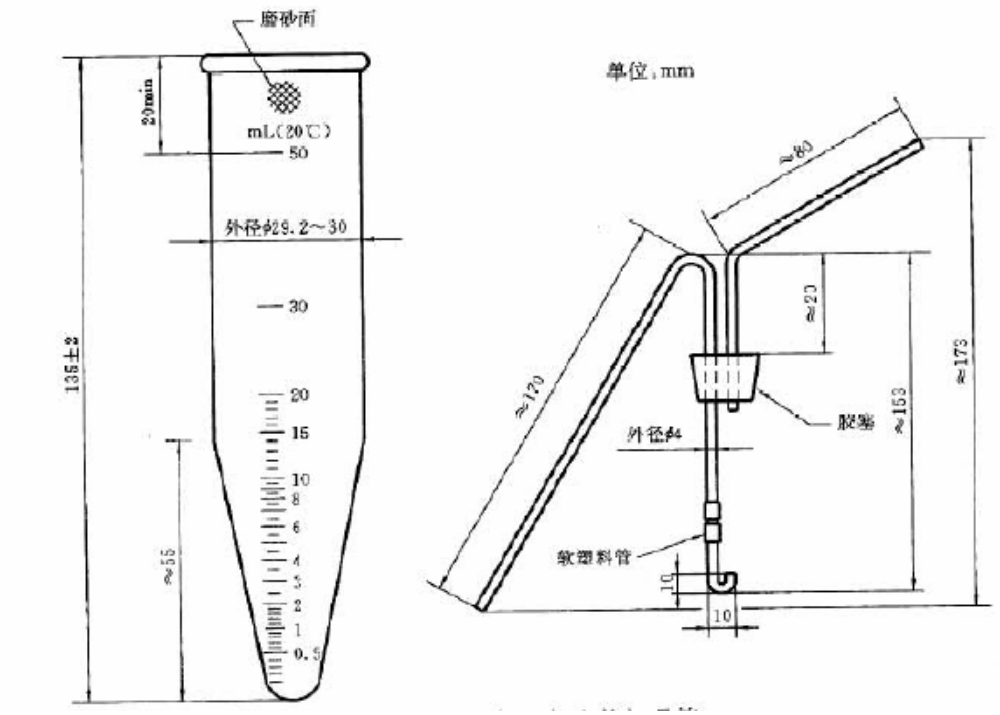


图 2 离心管和相配的虹吸管

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6 分析步骤

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 48 h，以便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（24 ℃或 50 ℃），分别将搅拌杯（5.8）的温度调整到 24.0 ℃±0.2 ℃或 50.0 ℃±0.2 ℃。方法是将搅拌杯放入水浴（5.1）中一段时间，水位接近杯顶。

6.3 样品部分

用勺或称样纸（5.3）称样，精确至 0.01 g，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：13.00 g；

b） 脱脂乳粉和酪乳粉：10.00 g；

c） 乳清粉：7.00 g。

6.4 测定

6.4.1 从水浴中取出搅拌杯（见 6.2），迅速擦干杯外部的水，用量筒（5.5）向杯中加入 100 mL±0.5 mL、24 ℃±0.2 ℃或 50.0 ℃±0.2 ℃的水。

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），以便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 90 s 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 5 s 内的转速调到 3600 转/分钟±100 转/分钟，并混合 90 s。

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），将杯在室温下静置 5 min 以上，但不超过 15 min。

6.4.5 向杯内的混合物加入 3 滴硅酮消泡剂，用平勺（5.10）彻底混合杯中内容物 10 s（不要过度），然后立即将混合物倒入离心管（5.12）中至 50 mL 刻度处，即顶部液位与 50 mL 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 160 g_n 的加速度，然后在 20 ℃～25 ℃下使之旋转 5 min。

6.4.7 取出离心管，用平勺（5.10）去除和倾倒掉管内上层脂肪类物质。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，则吸到顶部液体与 15 mL 刻度处重合，若为喷雾干燥乳粉，则与 10 mL 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 15 mL 或 10 mL，则不再进行下部操作，记录不溶度指数为“15 mL”或“＞10 mL”，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，直到液位与 30 mL 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 50 mL 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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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 5 min。

注：建议将离心管放入离心机中时，使离心管的刻度线的方向与离心机旋转的方向一致。这样即使使沉淀物顶部倾斜，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（见注），使眼睛与沉淀顶部平齐，借助放大镜（5.15）读取沉淀物体积数。如果沉淀物体积小于 0.5 mL，则精确至 0.05 mL。如果沉淀物体积大于 0.5 mL，则精确至 0.1 mL。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。

注：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。

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，同时应报告复原时所用水的温度。例如：

0.10 mL（24 ℃）

4.1 mL（50 ℃）

8 其他

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 0.138 M，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。

8.3 注意事项

8.3.1 实验一旦开始，就应连续进行。必须严格遵守所有关于温度和时间的规定。

8.3.2 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。

8.3.3 该检验中允许有 5 min～15 min 的放置时间（6.4.4）。在 10 min 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 100 mL±0.5 mL 水（温度适当）。当杯内水温度稳定在正确值后，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。

8.3.4 各试样量等于：混合时，100 mL 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。

8.3.5 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。

第二法 溶解度的测定

9 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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10 仪器和设备

10.1 离心管：50 mL，厚壁、硬质。

10.2 烧杯：50 mL。

10.3 离心机：转速同 5.11。

10.4 称量皿：直径 50 mm～70 mm 的铝皿或玻璃皿。

11 分析步骤

11.1 称取样品 5 g（准确至 0.01 g）于 50 mL 烧杯中，用 38 mL25 ℃～30 ℃的水分数次将乳粉溶解于 50 mL 离心管中，加塞。

11.2 将离心管置于 30 ℃水中保温 5 min，取出，振摇 3 min。

11.3 置离心机中，以适当的转速离心 10 min，使不溶物沉淀。倾去上清液，并用棉栓擦净管壁。

11.4 再加入 25 ℃～30 ℃的水 38 mL，加塞，上下振荡，使沉淀悬浮。

11.5 再置离心机中离心 10 min，倾去上清液，用棉栓仔细擦净管壁。

11.6 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 2 mg）。

12 分析结果的表述

样品溶解度按式（1）计算：

$$X = 100 - \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{(1 - B) \times m} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X——样品的溶解度，单位为克每百克（g/100g）；

m——样品的质量，单位为克（g）；

m_1——称量皿质量，单位为克（g）；

m_2——称量皿和不溶物干燥后质量，单位为克（g）；

B——样品水分，单位为克每百克（g/100g）。

注：加糖乳计算时要扣除加糖量。

13 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 2 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.30—2010

食品安全国家标准
乳和乳制品杂质度的测定

National food safety standard

Determination of impurities in milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5413.30-1997《乳与乳粉 杂质度的测定》。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5413.30-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳和乳制品杂质度的测定

1 范围

本标准规定了乳和乳制品杂质度的测定方法。

本标准适用于巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、炼乳及乳粉杂质度的测定，不适用于含非乳蛋白质、淀粉类成分、不溶性有色物质及影响过滤的添加物质。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样经过滤板过滤、冲洗，根据残留于过滤板上的可见带色杂质的数量确定杂质量。

4 仪器和设备

4.1 过滤设备：杂质度过滤机或配有可安放过滤板漏斗的 2000 mL～2500 mL 抽滤瓶。

4.2 过滤板：直径 32 mm，单位面积质量为 135g/m^2，符合附录 A 的要求，过滤时通过面积的直径为 28.6 mm。

4.3 杂质度标准板。

4.4 杂质度标准板的制作方法见附录 B。

4.5 天平：感量为 0.1 g。

5 分析步骤

液体乳样量取 500 mL；乳粉样称取 62.5 g（精确至 0.1 g），用 8 倍水充分调和溶解，加热至 60 ℃；炼乳样称取 125 g（精确至 0.1 g），用 4 倍水溶解，加热至 60 ℃，于过滤板上过滤，为使过滤迅速，可用真空泵抽滤，用水冲洗过滤板，取下过滤板，置烘箱中烘干，将其上杂质与标准杂质板比较即得杂质度。

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。

6 分析结果的表述

与杂质度标准比较得出的过滤板上的杂质量，即为该样品的杂质度。

7 精密度

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（规范性附录）
杂质度过滤板的检验

A.1 试剂盒材料

A.1.1 润湿剂：1%溶液。使用一种湿雾剂或其他合适的润湿剂。

A.1.2 植物胶溶液：将 0.75g 角豆胶或其他合适的胶加到 100 mL 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 2 mL40 %甲醛溶液。

为了便于在没有搅拌的情况下在水中分离，可将 0.75 g 角豆胶溶入 100 mL 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。

A.1.3 蔗糖溶液：将 750 g 市售白砂糖溶于 750 mL 水中。

A.1.4 精制杂质混合物：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，收集能通过 106 μm（140 目）但不能通过 75 μm（200 目）的筛子成分，做法如下：

放 100 g 以下的牛粪或泥土，50 g 以下的木炭，过筛。在 106 μm（140 目）的筛子外套装 75 μm（200 目）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 20 g，以过 106 μm（140 目）筛子的碎片继续在 75 μm（200 目）的筛子上过 5 min。使用第二次过筛所保留的成分，按表 A.1 最大程度的混合均匀：

表 A.1 第二次过筛后所保留成分的比例

杂质	含量（%）
牛粪	66
泥土	28
木炭	6

将 2 g 上述混合物放入到 100 mL 容量瓶中，用 5 mL 润湿剂（A.1.1）润湿。加入 46 mL 植物胶溶液，然后用蔗糖溶液（A.1.3）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 250 mL 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 转/分钟～300 转/分钟的速度搅拌，直到杂质在明亮的反射光下均匀分布为止。搅拌时，不要使细小颗粒堆积在烧杯底部的旋涡处。用吸管（出口直径 3 mm）移取 10 mL（大约相当于 200 mg 杂质混合物）于容量瓶中，用水定容到 1000 mL。

A.2 仪器和设备

A.2.1 天平：感量为 0.1 mg。

A.2.2 干燥器：含有效干燥剂。

A.2.3 干燥箱。

A.2.4 过滤装置。

A.2.5 过滤板。

A.2.6 滤纸：直径 7 cm 或 9 cm。

A.3 分析步骤

A.3.1 将滤纸（A.2.6）放在一个布氏漏斗中，用大约 200 mL 的水冲洗，然后放入 100℃烘箱中烘干至恒重。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.3.2　将 60 mL 精制杂质混合物（A.1.4）经过充分搅拌后，通过安装在过滤装置上的过滤板（A.2.5）过滤，相当于 12 mg 杂质。

用一个清洁的三角瓶收集滤液。将滤液转移到烧杯中，用水冲洗该三角瓶两次，将洗液全部加入到烧杯中。

A.3.3　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（A.3.1）。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。

A.3.4　至少检验两个以上过滤板。

A.4　评价

通过三个或三个以上过滤板杂质的平均量不超过 2.8 mg。根据精制的杂质混合物制备的标准板不应在表面下层出现杂质。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 B
（规范性附录）
杂质度标准板的制作

B.1 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 850μm（20 目）筛而不通过 425μm（40 目）筛的占 10 %；
通过 425μm（40 目）筛而不通过 250μm（60 目）筛的占 30 %；
灰土占 30 %，可通过 425μm（40 目）筛。
牛粪占 20 %，其中：
通过 850μm（20 目）目筛而不通过 425μm（40 目）筛的占 2 %；
通过 425μm（40 目）筛而不通过 250（60 目）筛的占 8 %；
通过 250μm（60 目）筛而不通过 180μm (80 目)筛的占 10 %；
木炭占 10 %，其中：
通过 850μm（20 目）筛而不通过 425μm（40 目）筛的占 4 %；
通过 425μm（40 目）筛而不通过 250（60 目）筛的占 6 %。

B.2 步骤

B.2.1 将已准备好的各种杂质混匀（总量以 50 g 为宜），从中准确称取 1.000 g，直接倒入 500 mL 容量瓶中，加蒸馏水 2 mL 和体积分数为 0.75 %经过过滤的阿拉伯胶液 23 mL，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 2 mg/mL。

B.2.2 取浓度为 2 mg/mL 的杂质液 10 mL，以 500 g/L 过滤的蔗糖液稀释至 100 mL，则此液杂质的浓度为 0.2 mg/mL。

B.2.3 取浓度为 0.2 mg/mL 的杂质液 10 mL，以 500 g/L 过滤的蔗糖液稀释至 100 mL，则此液杂质的浓度为 0.02 mg/mL。

B.2.4 以 500 mL 牛乳或 62.5 g 乳粉为取样量，按表 B.1 制备各标准杂质板。

表 B.1 各标准杂质板的制备比例

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.33—2010

食品安全国家标准
生乳相对密度的测定

National food safety standard

Determination of specific gravity in raw milk

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB/T 5009.46-2003《乳与乳制品卫生标准的分析方法》中新鲜生乳相对密度的测定和 GB/T 5409-85《牛乳检验方法》中牛乳比重的测定。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5009.46-1985、GB/T 5009.46-1996、GB/T 5009.46-2003；

——GB/T 5409-85。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
生乳相对密度的测定

1 范围

本标准规定了生乳相对密度的测定方法。
本标准适用于生乳相对密度的测定。

2 原理

使用密度计检测试样，根据读数经查表可得相对密度的结果。

3 仪器和设备

3.1 密度计：20 ℃/4 ℃。

3.2 玻璃圆筒或 200 mL～250 mL 量筒：圆筒高度应大于密度计的长度，其直径大小应使在沉入密度计时其周边和圆筒内壁的距离不小于 5 mm。

4 分析步骤

取混匀并调节温度为 10 ℃～25 ℃的试样，小心倒入玻璃圆筒内，勿使其产生泡沫并测量试样温度。小心将密度计放入试样中到相当刻度 30°处，然后让其自然浮动，但不能与筒内壁接触。静置 2 min～3 min，眼睛平视生乳液面的高度，读取数值。根据试样的温度和密度计读数查表 1 换算成 20 ℃时的度数。

5 分析结果的表述

相对密度（ρ_4^{20}）与密度计刻度关系式见式（1）：

$$\rho_4^{20} = \frac{X}{1000} + 1.000 \quad \cdots\cdots（1）$$

式中：
ρ_4^{20}——样品的相对密度；
X——密度计读数。

当用 20 ℃/4 ℃密度计，温度在 20 ℃时，将读数代入式(1)相对密度即可直接计算；不在 20 ℃时，要查表 1 换算成 20 ℃时度数，然后再代入式(1)计算。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　密度计读数变为温度 20 ℃时的度数换算表

密度计读数	生乳温度/℃															
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
25	23.3	23.5	23.6	23.7	23.9	24.0	24.2	24.4	24.6	24.8	25.0	25.2	25.4	25.5	25.8	26.0
26	24.2	24.4	24.5	24.7	24.9	25.0	25.2	25.4	25.6	25.8	26.0	26.2	26.4	26.6	26.8	27.0
27	25.1	25.3	25.4	25.6	25.7	25.9	26.1	26.3	26.5	26.8	27.0	27.2	27.5	27.7	27.9	28.1
28	26.0	26.1	26.3	26.5	26.6	26.8	27.0	27.3	27.5	27.8	28.0	28.2	28.5	28.7	29.0	29.2
29	26.9	27.1	27.3	27.5	27.6	27.8	28.0	28.3	28.5	28.8	29.0	29.2	29.5	29.7	30.0	30.2
30	27.9	28.1	28.3	28.5	28.6	28.8	29.0	29.3	29.5	29.8	30.0	30.2	30.5	30.7	31.0	31.2
31	28.8	28.0	29.2	29.4	29.6	29.8	30.0	30.3	30.5	30.8	31.0	31.2	31.5	31.7	32.0	32.2
32	29.3	30.0	30.2	30.4	30.6	30.7	31.0	31.2	31.5	31.8	32.0	32.3	32.5	32.8	33.0	33.3
33	30.7	30.8	31.1	31.2	31.5	31.7	32.0	32.2	32.5	32.8	33.0	33.3	33.5	33.8	34.1	34.3
34	31.7	31.9	32.1	32.3	32.5	32.7	33.0	33.2	33.5	33.8	34.0	34.3	34.4	34.8	35.1	35.3
35	32.6	32.8	33.1	33.3	33.5	33.7	34.0	34.2	34.5	34.7	35.0	35.3	35.5	35.8	36.1	36.3
36	33.5	33.8	34.0	34.3	34.5	34.7	34.9	35.2	35.6	35.7	36.0	36.2	36.5	36.7	37.0	37.3

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.34—2010

食品安全国家标准
乳和乳制品酸度的测定

National food safety standard

Determination of acidity in milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准第一法中给出了两种方法。基准法为等效采用国际乳品联合会标准IDF 86:1978 Dried milk-Determination of titratable acidity (reference method)；常规法为等效采用国际乳品联合会标准IDF 81:1981 Dried milk- Determination of titratable acidity (routine method)；基准法为仲裁法。

本标准代替GB/T 5009.46-2003《乳与乳制品卫生标准的分析方法》中酸度的测定、GB/T 5416-85《奶油检验方法》中酸度的测定、GB/T 5409-85《牛乳检验方法》中牛乳新鲜度试验和GB/T 5413.28-1997《乳粉 滴定酸度的测定》。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5409-85；

——GB/T 5413.28-1997；

——GB/T 5416-85；

——GB 5009.46-1985、GB/T 5009.46-1996、GB/T 5009.46-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳和乳制品酸度的测定

1 范围

本标准规定了乳粉、巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳、炼乳、奶油及干酪素酸度的测定方法。

本标准第一法适用于乳粉酸度的测定；第二法适用于巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳、炼乳、奶油及干酪素酸度的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 乳粉中酸度的测定

基准法

3 原理

中和 100 mL 干物质为 12 %的复原乳至 pH 为 8.3 所消耗的 0.1 mol/L 氢氧化钠体积，经计算确定其酸度。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 氢氧化钠标准溶液（NaOH）：0.1000 mol/L。

4.2 氮气。

5 仪器和设备

5.1 天平：感量为 1 mg。

5.2 滴定管：分刻度为 0.1 mL，可准确至 0.05 mL。

5.3 pH 计：带玻璃电极和适当的参比电极。

5.4 磁力搅拌器。

6 分析步骤

6.1 试样的制备

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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。

6.2 测定

6.2.1 称取4 g样品（精确到0.01 g）于锥形瓶中。

6.2.2 用量筒量取96 mL约20 ℃的水，使样品复原，搅拌，然后静置20 min。

6.2.3 用滴定管向锥形瓶中滴加氢氧化钠溶液（4.1），直到pH达到8.3。滴定过程中，始终用磁力搅拌器进行搅拌，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1 min内完成。记录所用氢氧化钠溶液的毫升数，精确至0.05 mL，代入公式（1）计算。

常规法

7 原理

以酚酞作指示剂，硫酸钴作参比颜色，用 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定 100 mL 干物质为 12 % 的复原乳至粉红色所消耗的体积经计算确定其酸度。

8 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

8.1 氢氧化钠标准溶液：同 4.1。

8.2 参比溶液：将 3g 七水硫酸钴（$CoSO_4 \cdot 7H_2O$）溶解于水中，并定容至 100 mL。

8.3 酚酞指示液：称取 0.5 g 酚酞溶于 75 mL 体积分数为 95 %的乙醇中，并加入 20 mL 水，然后滴加氢氧化钠溶液（8.1）至微粉色，再加入水定容至 100 mL。

9 仪器和设备

9.1 分析天平：感量为 1 mg。

9.2 滴定管：分刻度为 0.1 mL，可准确至 0.05 mL。

10 分析步骤

10.1 样品的制备同 6.1。

10.2 测定

10.2.1 试样的称取及溶解同 6.2.1、6.2.2。

10.2.2 向其中的一只锥形瓶中加入2.0 mL参比溶液（8.2），轻轻转动，使之混合，得到标准颜色。 如果要测定多个相似的产品，则此标准溶液可用于整个测定过程，但时间不得超过2 h。

10.2.3 向第二只锥形瓶中加入2.0 mL酚酞指示液（8.3），轻轻转动，使之混合。用滴定管向第二只锥形瓶中滴加氢氧化钠溶液（8.1），边滴加，边转动烧瓶，直到颜色与标准溶液的颜色相似，且5 s内不消退，整个滴定过程应在45 s内完成。记录所用氢氧化钠溶液的毫升数，精确至0.05 mL，代入公式（1）计算。

11 分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

试样中的酸度数值以（°T）表示，按式（1）计算：

$$X_1 = \frac{c_1 \times V_1 \times 12}{m_1 \times (1-w) \times 0.1} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_1——试样的酸度，单位为度（°T）；

c_1——氢氧化钠标准溶液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_1——滴定时所用氢氧化钠溶液的毫升数，单位为毫升（mL）；

m_1——称取样品的质量，单位为克（g）；

w ——试样中水分的质量分数，单位为克每百克（g/100g）；

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

0.1——酸度理论定义氢氧化钠的摩尔浓度，单位为摩尔每升（mol/L）。

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

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×0.009。T为样品的滴定酸度（0.009为乳酸的换算系数，即1 mL0.1 mol/L的氢氧化钠标准溶液相当于0.009 g乳酸。）

12 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过1.0 °T。

第二法 乳及其它乳制品中酸度的测定

13 原理

以酚酞为指示液，用0.1000 mol/L氢氧化钠标准溶液滴定100 g试样至终点所消耗的氢氧化钠溶液体积，经计算确定试样的酸度。

14 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的三级水。

14.1 中性乙醇—乙醚混合液：取等体积的乙醇、乙醚混合后加 3 滴酚酞指示液，以氢氧化钠溶液（4 g/L）滴至微红色。

14.2 氢氧化钠标准溶液：同 4.1。

14.3 酚酞指示液：同 8.3。

15 仪器和设备

15.1 天平：感量为 1 mg。

15.2 电位滴定仪。

15.3 滴定管：分刻度为0.1 mL。

15.4 水浴锅。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

16 分析步骤

16.1 巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳

称取 10 g（精确到 0.001 g）已混匀的试样，置于 150 mL 锥形瓶中，加 20 mL 新煮沸冷却至室温的水，混匀，用氢氧化钠标准溶液（14.2）电位滴定至 pH 8.3 为终点；或于溶解混匀后的试样中加入 2.0 mL 酚酞指示液（14.3），混匀后用氢氧化钠标准溶液（14.2）滴定至微红色，并在 30 s 内不褪色，记录消耗的氢氧化钠标准滴定溶液毫升数，代入公式（2）中进行计算。

16.2 奶油

称取 10 g（精确到 0.001 g）已混匀的试样，加 30 mL 中性乙醇—乙醚混合液（14.1），混匀，以下按 16.1“用氢氧化钠标准溶液电位滴定至 pH 8.3 为终点……”操作。

16.3 干酪素

称取 5 g（精确到 0.001 g）经研磨混匀的试样于三角瓶中，加入 50 mL 水，于室温下（18℃～20℃放置 4 h～5 h，或在水浴锅中加热到 45 ℃并在此温度下保持 30 min，再加 50 mL 水，混匀后，通过干燥的滤纸过滤。吸取滤液 50 mL 于三角瓶中，用氢氧化钠标准溶液（14.2）电位滴定至 pH8.3 为终点；或于上述 50 mL 滤液中加入 2.0 mL 酚酞指示液（14.3），混匀后用氢氧化钠标准溶液（14.2）滴定至微红色，并在 30 s 内不褪色，将消耗的氢氧化钠标准溶液毫升数代入公式（3）进行计算。

16.4 炼乳

称取 10 g（精确到 0.001 g）已混匀的试样，置于 250 mL 锥形瓶中，加 60 mL 新煮沸冷却至室温的水溶解，混匀，以下按 16.1“用氢氧化钠标准溶液电位滴定至 pH8.3 为终点……”操作。

17 分析结果的表述

试样中的酸度数值以（°T）表示，按下式计算：

$$X_2 = \frac{c_2 \times V_2 \times 100}{m_2 \times 0.1} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X_2——试样的酸度，单位为度（°T）；

c_2——氢氧化钠标准溶液的摩尔浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

V_2——滴定时消耗氢氧化钠标准溶液体积，单位为毫升（mL）；

m_2——试样的质量，单位为克（g）；

0.1——酸度理论定义氢氧化钠的摩尔浓度，单位为摩尔每升（mol/L）。

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

$$X_3 = \frac{c_3 \times V_3 \times 100 \times 2}{m_3 \times 0.1} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X_3——试样的酸度，单位为度（°T）；

c_3——氢氧化钠标准溶液的摩尔浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

V_3——滴定时消耗氢氧化钠标准溶液体积，单位为毫升（mL）；

m_3——试样的质量，单位为克（g）；

0.1——酸度理论定义氢氧化钠的摩尔浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

2——试样的稀释倍数。

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

18 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过1.0 °T。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.35—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中β-胡萝卜素的测定

National food safety standard

Determination of β-carotene in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准部分参考了国际分析家学会（AOAC）2005.7 β-Carotene in supplement and raw material的方法。

本标准附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准系首次发布。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中β-胡萝卜素的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中β-胡萝卜素的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中β-胡萝卜素的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样经皂化后，使β-胡萝卜素完全变为游离态。用石油醚萃取后，反相色谱法分离，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 α-淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 无水硫酸钠（Na_2SO_4）。

4.3 抗坏血酸($C_6H_8O_6$)。

4.4 石油醚：沸程 30 ℃～60 ℃。

4.5 甲醇(CH_4O)：色谱纯。

4.6 乙腈(C_2H_3N)：色谱纯。

4.7 三氯甲烷($CHCl_3$)：色谱纯。

4.8 正己烷(C_6H_{14})：色谱纯。

4.9 乙醇：体积分数为 95 %。

4.10 氢氧化钾溶液：称固体氢氧化钾 250 g，加入 200 mL 水溶解。临用前配制。

4.11 β-胡萝卜素标准品。

4.12 β-胡萝卜素标准溶液。

4.12.1 β-胡萝卜素标准储备液（500 μg/mL）：准确称取 β-胡萝卜素标准品（4.11）50 mg（精确到 0.1 mg），用正己烷（4.8）定容至 100 mL 棕色容量瓶中。

注：β-胡萝卜素标准储备液需要-10 ℃以下避光储存，使用期限不超过3个月。标准储备液用前需校正，具体操作见

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A。

4.12.2 β-胡萝卜素标准中间液（100 μg/mL）：从β-胡萝卜素标准储备液（4.12.1）中准确移取 10.0 mL 溶液于 50 mL 棕色容量瓶中，用正己烷（4.8）定容至刻度。

4.12.3 β-胡萝卜素标准工作液：从β-胡萝卜素标准中间液（4.12.2）中分别准确移取 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mL 溶液转入 5 个 100 mL 棕色容量瓶中，用正己烷（4.8）定容至刻度，得到浓度为 0.5、1.0、2.0 、3.0 、4.0 μg/mL 的系列标准工作液。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 恒温磁力搅拌器：20 ℃～80 ℃。

5.4 离心机：转速≥5000 转/分钟。

5.5 分析天平：感量为 0.1 mg 。

5.6 氮吹仪。

5.7 培养箱：60 ℃±2 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 淀粉类试样

称取混合均匀的固体试样约5 g或液体试样约50 g（均精确至0.0001 g）于250 mL三角瓶中，加入1.0 g抗坏血酸(4.3)，固体试样需用50 mL45 ℃～50 ℃的水溶解并混合均匀。加入l g α-淀粉酶（4.1），向三角瓶中充氮后盖上瓶塞，置60 ℃±2 ℃培养箱（5.7）内酶解30 min。

6.1.2 非淀粉类试样

称取混合均匀的固体试样约10 g或液体试样约50 g（均精确至0.0001 g），置于250 mL三角瓶中，加入1.0 g抗坏血酸(4.3)，固体试样需用50 mL 45 ℃～50 ℃的水溶解并混合均匀。

6.2 待测液的制备

6.2.1 皂化：将 100 mL 95%乙醇（4.9）加入到上述试样溶液中，混匀并加入 25 mL 氢氧化钾溶液（4.10）混匀，放入磁力棒，充入氮气排出空气，盖上胶塞。将 1000 mL 的烧杯中加入约 300 mL 的水，将烧杯放在恒温磁力搅拌器（5.3）上，当水温控制在 53 ℃±2 ℃时，将三角瓶放入烧杯中，磁力搅拌皂化约 45 min 后，取出立刻冷却到室温。

6.2.2 提取：将皂化液全部转入 500 mL 分液漏斗中，加入 100 mL 石油醚（4.4），轻轻摇动，排气，盖好瓶塞，室温下振荡 10 min 后静置分层，将水相转入另一分液漏斗中按上述方法进行第二次提取。合并有机相，用水洗至近中性。有机相通过无水硫酸钠（4.2）过滤脱水。滤液收入 500 mL 烧瓶中，于旋转蒸发器（5.2）上在 40 ℃±2 ℃的充氮条件下蒸至近干（绝不允许蒸干）。用石油醚（4.4）溶解残渣并转移至 10 mL 容量瓶中定容。

从上述容量瓶中准确移取2.0 mL石油醚溶液于10 mL螺盖试管中，在40 ℃±2 ℃氮吹仪（5.6）上吹干。向试管中加1.0 mL正己烷（4.8），振荡溶解残渣。再将试管以不低于5000 转/分钟的速度离心（5.4）10 min，取出静置至室温后待测。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

注：实验操作过程中应注意避光。

6.3 色谱测定

6.3.1 参考色谱条件

色谱柱：C_{18}柱，250 mm×4.6 mm，5 μm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：三氯甲烷－腈－甲醇=3+12+85，将1 L的流动相中加入0.4 g的抗坏血酸，经0.45 μm膜过滤后备用。

流速：2.0 mL/min。

检测波长：450 nm。

柱温：35 ℃±1 ℃。

进样体积：20 μL。

6.3.2 标准曲线的绘制

分别将β-胡萝卜素标准工作液(4.12.3)注入液相色谱仪中（色谱图参见附录B），得到峰面积。以峰面积为纵坐标，以β-胡萝卜素标准工作液浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.3.3 试样测定

将待测液（6.2.2）注入液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中β-胡萝卜素的浓度。

7 分析结果的表述

试样中β-胡萝卜素的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times 10 \times 100}{m \times 2} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中β-胡萝卜素的含量，单位为微克每百克（μg/100g）；

c——从标准曲线得到待测液中β-胡萝卜素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

10——样液体积。

注：此计算结果为顺、反式β-胡萝卜素的总量。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

9 其他

本标准检出限为 2 μg/100g。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A
（规范性附录）
标准溶液浓度校正方法

β-胡萝卜素标准储备液配制后需要校正，具体操作如下：

取β-胡萝卜素标准储备液（浓度为500 μg/mL）10 μL，注入含3.0 mL正己烷的比色皿中，混匀。测定其吸光值，比色杯厚度为1 cm，以正己烷为空白，入射光波长为450 nm，平行测定3次，取均值。

按（2）式计算溶液浓度：

$$X = \frac{A}{E} \times \frac{3.01}{0.01} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——β-胡萝卜素溶液浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

A——β-胡萝卜素的紫外吸光值；

E——β-胡萝卜素在正己烷溶液中，入射光波长为450 nm，比色杯厚度为1 cm，溶液浓度为1 mg/L的吸光系数为0.2638；

$\frac{3.01}{0.01}$——测定过程中稀释倍数的换算系数。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 B
（资料性附录）
标准品液相色谱图

B.1 β-胡萝卜素标准品液相色谱图

β-胡萝卜素标准品液相色谱图见图 B.1。

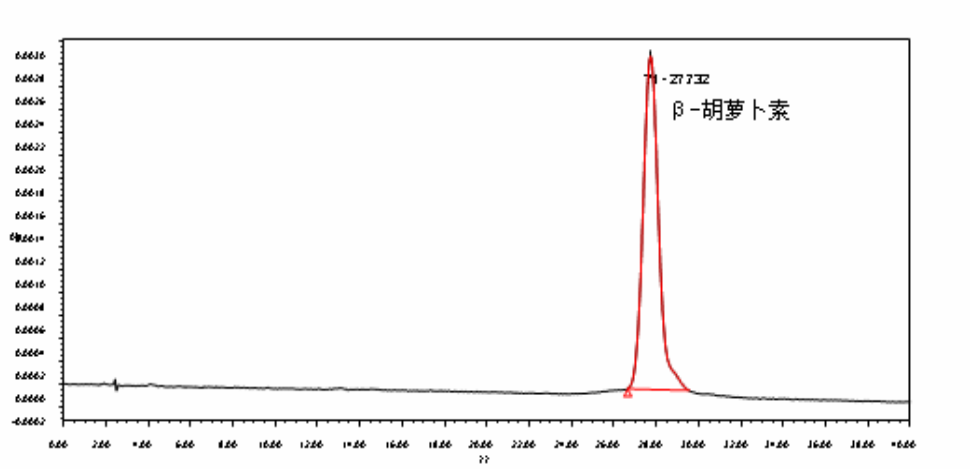


图 B.1 β-胡萝卜素标准品色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.36—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定

National food safety standard

Determination of trans fatty acids in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准附录A为资料性附录。

本标准系首次发布。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

试样中的脂肪用溶剂提取。提取物在碱性条件下与甲醇反应生成脂肪酸甲酯，用配有氢火焰离子化检测器的气相色谱仪分离顺式脂肪酸甲酯和反式脂肪酸甲酯，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 石油醚：沸程 30 ℃～60 ℃。

4.2 乙醚（$C_4H_{10}O$）。

4.3 乙醇（C_2H_6O）：体积分数为 95 %。

4.4 正己烷（C_6H_{14}）：色谱纯。

4.5 氨水（$NH_3 \cdot H_2O$）：25 %～28 %。

4.6 氢氧化钾（KOH）。

4.7 甲醇（CH_4O）。

4.8 淀粉酶：活力单位：1.5 U/mg，根据活力单位大小调整用量。

4.9 无水硫酸钠（Na_2SO_4）。

4.10 氢氧化钾-甲醇溶液（4 mol/L）：称取 26.4 g 氢氧化钾，溶于约 80 mL 甲醇中。冷却至室温，用甲醇定容至 100 mL，加入约 5g 无水硫酸钠（4.9），充分搅拌后过滤，保留滤液。

4.11 脂肪酸甲酯标准品：十八酸甲酯（C18:0）、反-9-十八碳一烯酸甲酯（C18:1-9t）、顺-9-十八碳一烯酸甲酯（C18:1-9c）、反-9，12-十八碳二烯酸甲酯（C18:2-9t，12t）、顺-9，12-十八碳二烯酸甲酯（C18:2-9c，12c），放入冰箱在-15 ℃以下保存。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.12　反式脂肪酸甲酯标准贮备液：浓度分别为 10.0 mg/ mL。称取 500 mg（精确到 0.1 mg）反-9-十八碳一烯酸甲酯标准品和反-9，12-十八碳二烯酸甲酯标准品，分别用正己烷溶解并定容至 50.0 mL。放入冰箱在-15 ℃以下保存。

4.13　反式脂肪酸甲酯标准中间液：浓度分别为 1.0 mg/ mL。分别吸取两种反式脂肪酸甲酯标准储备液（4.12）10.0 mL 入同一 100 mL 容量瓶中并用正己烷（4.4）定容。临用前配制。亦作为标准曲线最高浓度。

4.14　反式脂肪酸甲酯标准工作液：临用前配制。分别吸取反式脂肪酸甲酯标准中间液（4.13），0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用正己烷定容，此浓度即为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 、1.0 mg/mL 的标准工作液。

4.15　脂肪酸甲酯标准混合液：将脂肪酸甲酯标准品（4.11），用正己烷配制成脂肪酸甲酯标准混合溶液，其中每种成分的浓度约为 0.05 mg/mL 至 0.5 mg/mL。用于进行顺反脂肪酸甲酯分离程度及定性的鉴定。

4.16　刚果红溶液：称取 1 g 刚果红溶解稀释至 100 mL。

5　仪器和设备

5.1　气相色谱仪，带氢火焰离子化检测器。

5.2　旋转蒸发器。

5.3　恒温水浴：40 ℃～80 ℃。

5.4　涡旋振荡器。

5.5　离心机：转速≥4000 转/分钟。

5.6　毛氏抽脂瓶。

5.7　毛氏抽脂瓶摇混器。

5.8　脂肪收集瓶：圆底烧瓶，与旋转蒸发仪配套。

5.9　天平：感量为 0.1 mg。

6　分析步骤

6.1　试样处理

6.1.1　含淀粉的试样：称取混合均匀的固体试样约 1.5 g，液体试样约 5 g（精确到 0.1 mg）于毛氏抽脂瓶中，加入约 0.1 g 淀粉酶（酶活力 1.5 U/mg），混合均匀后，加入 8 mL～10 mL 45 ℃±2 ℃的水，摇匀。盖上瓶塞置于 55 ℃±2 ℃水浴（5.3）中 2 h，每隔 10min 摇混一次。加入两滴约 0.1 mol/L 的碘溶液，检验淀粉是否水解完全。若无蓝色出现，则水解完全，否则将毛氏抽脂瓶重新置于水浴中，直至蓝色消失，取出冷却至室温。

6.1.2　不含淀粉的试样：称取混合均匀的固体试样约 1.5 g，液体试样约 10g（精确到 0.1 mg）于毛氏抽脂瓶（5.6）中，加入 10 mL 45 ℃±2 ℃的水，将试样洗入毛氏抽脂瓶（5.6）的小球中，充分混合，直到试样完全散开，冷却至室温。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.1.3 脂肪的提取：向毛氏抽脂瓶（5.6）中加入 3.0 mL 氨水（4.5），混匀。置于 60 ℃±2 ℃水浴（5.3）中 15 min～20 min，冷却至室温。加入 10 mL 乙醇（4.3）和 1 滴刚果红溶液（4.16），混匀。再加入 25mL 乙醚（4.2），塞上软木塞，放到毛氏抽脂瓶（5.6）摇混器上震荡 1 min，也可采用手动振摇方式，再加入 25mL 石油醚（4.1），震荡 1 min，不低于 4000 转/分钟离心分层。倾出上清液于脂肪收集瓶（5.8）中，为第一次提取。在剩余试样液中再加入 5 mL 乙醇，25 mL 乙醚，25 mL 石油醚按上述操作步骤进行第二次提取。用离心机（5.5）离心分层后倾出上清液与第一次的上清液合并。将脂肪收集瓶（5.8）置于旋转蒸发器（5.2）上，在 60 ℃±2 ℃通入氮气条件下旋转蒸发除去溶剂，保留残渣，即为脂肪。

6.1.4 脂肪酸甲酯的制备：将上述脂肪用正己烷（4.4）溶解并定容至 10.0 mL，取出 3.0 mL 于 10 mL 具塞试管中，加入 0.3 mL 氢氧化钾-甲醇溶液（4.10）。盖紧瓶盖，涡旋振荡器（5.4）上剧烈振摇 2 min，4000 转/分钟离心 5 min 后将上清液转入气相色谱试样瓶中，此为试样测定液。

6.2 测定

6.2.1 参考色谱条件

色谱柱：填料为氰丙基芳基聚硅氧烷的毛细管柱，柱长100 m，内径0.25 mm，膜厚0.2 μm；或同等性能的色谱柱。

进样口温度：250 ℃；载气（N_2）。

检测器温度：300 ℃。

分流比：10：1。

进样量：1.0 μL。

程序升温：如表 1 所示。

表 1 程序升温条件

升温速率（℃/ min）	温度（℃）	保持时间（min）
	120	0
10	175	10
5	210	5
5	230	5

6.2.2 标准曲线的制备

在仪器最佳工作条件下，对系列标准工作液（4.14）分别进样，以峰面积为纵坐标，标准工作液浓度为横坐标绘制标准工作曲线。

6.2.3 反式脂肪酸甲酯色谱峰的鉴别

对脂肪酸甲酯标准混合溶液（4.15）进样，进行顺反脂肪酸甲酯分离程度及定性的鉴定。反十八碳一烯酸甲酯和反十八碳二烯酸甲酯色谱峰的位置参见附录A中的图A.1。

6.2.4 试样液的测定

将试样测定液注入气相色谱仪，试样测定液中反式脂肪酸甲酯峰位置参见附录A图A.1。分别测定区域C18：1t和区域C18：2t的峰面积，查标准曲线得到试样测定液中反十八碳一烯酸甲酯和反十八碳二烯酸甲酯的质量浓度。

7 分析结果的表述

试样中反十八碳一烯酸和反十八碳二烯酸含量分别计为 X_1 和 X_2，按式（1）分别计算：

$$X_{(1或2)} = \frac{c_i \times V \times M_{ai}}{m \times M_{bi}} \times 100 \cdots\cdots (1)$$

食品伙伴网http://www.foodmate.net

式中：

$X_{(1或2)}$——试样中反十八碳一烯酸或反十八碳二烯酸含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

V——试样的定容体积，单位毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

c_i——试样测定液中反十八碳一烯酸甲酯或反十八碳二烯酸甲酯的质量浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

M_{ai}——反十八碳一烯酸或反十八碳二烯酸的分子量；

M_{bi}——反十八碳一烯酸甲酯或反十八碳二烯酸甲酯的分子量。

试样中反式脂肪酸的总含量 X，按式（2）计算：

$$X = X_1 + X_2 \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——反式脂肪酸的总含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

X_1——试样中反十八碳一烯酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

X_2——试样中反十八碳二烯酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

9 其他

本标准检出限为：反式脂肪酸总含量 30 mg/kg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
反式脂肪酸混合标准溶液气相色谱图

A.1 反式脂肪酸混合标准溶液气相色谱图

反式脂肪酸混合标准溶液气相色谱图见图 A.1。

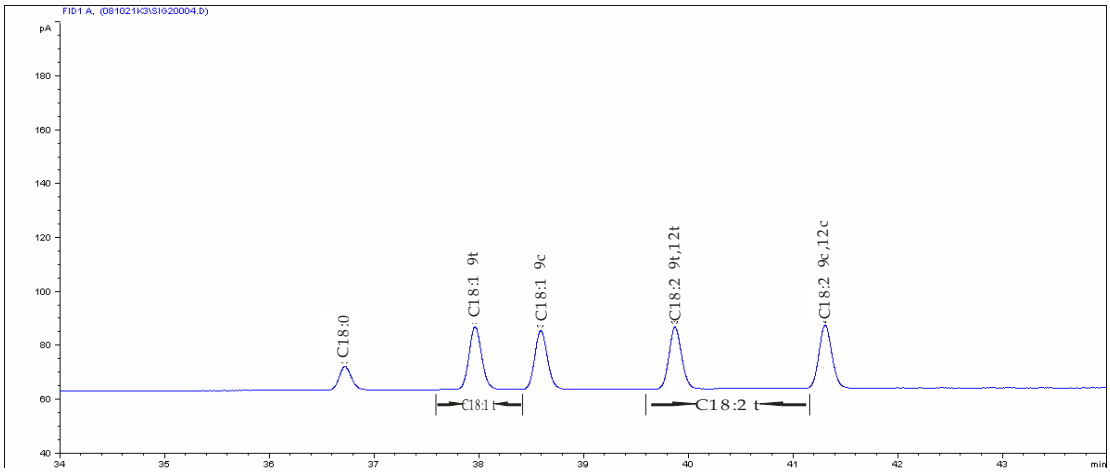


图 A.1 反式脂肪酸混合标准溶液气相色谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.37—2010

食品安全国家标准
乳和乳制品中黄曲霉毒素 M_1 的测定

National food safety standard

Determination of aflatoxin M_1 in milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准第一法对应于ISO14501：2007 Milk and milk powder-determination of aflatoxin M_1 content -clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography，本标准第一法与ISO14501：2007的一致性程度为非等效；本标准第二法和第三法代替GB/T 18980-2003；本标准第四法来自于NY/T 1664-2008《牛乳中黄曲霉毒素M_1的快速检测 双流向酶联免疫法》。

本标准附录A和附录B为资料性附录。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳和乳制品中黄曲霉毒素 M_1 的测定

1 范围

本标准规定了乳和乳制品中黄曲霉毒素 M_1 的测定方法。

标准第一法适用于乳和乳制品中黄曲霉毒素 M_1 的测定；第二法适用于乳、乳粉，以及低脂乳、脱脂乳、低脂乳粉和脱脂乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的测定；第三法适用于乳和乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的测定；第四法适用于液态乳和乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的测定。

2 规范性引用文件

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

第一法 免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法

3 原理

试样液体或固体试样提取液经均质、超声提取、离心，取上清液经免疫亲和柱净化，洗脱液经氮气吹干，定容，微孔滤膜过滤，经液相色谱分离，电喷雾离子源离子化，多反应离子监测（MRM）方式检测。基质加标外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲酸（HCOOH）。

4.2 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

4.3 石油醚（C_nH_{2n+2}）：沸程为30 ℃～60 ℃。

4.4 三氯甲烷（$CHCl_3$）。

4.5 氮气：纯度≥99.9 %。

4.6 黄曲霉毒素M_1标准样品：纯度≥98%。

4.7 乙腈-水溶液(1+4)：在400 mL水中加入100 mL乙腈。

4.8 乙腈-水溶液(1+9)：在450 mL水中加入50 mL乙腈。

4.9 0.1 % 甲酸水溶液：吸取1 mL 甲酸（4.1），用水稀释至1000 mL。

4.10 乙腈-甲醇溶液（50+50）：在500 mL乙腈中加入500 mL甲醇。

4.11 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L）：称取2 g氢氧化钠溶解于100 mL水中。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.12 空白基质溶液

分别称取与待测样品基质相同的、不含所测黄曲霉毒素的阴性试样8份于100 mL烧杯中。以下操作按6.1试液提取和6.2 净化步骤进行。合并所得8份试样的纯化液，用0.22 μm 微孔滤膜的一次性滤头（5.23）过滤。弃去前0.5 mL滤液，接取少量滤液供液相色谱－质谱联用仪检测。

获得色谱－质谱图后，对照附录 A 中的图 A.2，在相应的保留时间处，应不含黄曲霉毒素 M_1。剩余滤液转移至棕色瓶中，在-20 ℃电冰箱内保存，供配制标准系列溶液使用。

4.13 黄曲霉毒素M_1标准储备溶液：分别称取标准品黄曲霉毒素M_1 0.10 mg（精确至0.01 mg），用三氯甲烷（4.4）溶解定容至10 mL。此标准溶液浓度为0.01 mg/mL。溶液转移至棕色玻璃瓶中后，在-20 ℃电冰箱内保存，备用。

4.14 黄曲霉毒素M_1标准系列溶液：吸取黄曲霉毒素M_1 标准储备溶液（4.13）10 μL于10 mL容量瓶中，用氮气将三氯甲烷吹至近干，空白基质溶液（4.12）定容至刻度，所得浓度为10 ng/mL的M_1标准中间溶液。再用空白基质溶液（4.12）将黄曲霉毒素M_1标准中间溶液稀释为0.5 ng/mL、0.8 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、6.0 ng/mL、8.0 ng/mL的系列标准工作液。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱联用仪，带电喷雾离子源。

5.2 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3[1]，柱长100 mm，柱内径2.1 mm；填料粒径1.8 μm，或同等性能的色谱柱。

5.3 天平：感量为0.001 g和0.00001 g。

5.4 匀浆器。

5.5 超声波清洗器。

5.6 离心机：转速≥6000 转/分钟。

5.7 50 mL具塞PVC离心管。

5.8 水浴:温控30 ℃±2 ℃，50 ℃±2 ℃，温度范围25 ℃～60 ℃。

5.9 容量瓶:100 mL。

5.10 玻璃烧杯:250 mL，50 mL。

5.11 带刻度的磨口玻璃试管:5 mL，10 mL，20 mL。

5.12 移液管:1.0 mL，2.0 mL和50.0 mL。

5.13 玻璃棒。

5.14 10目圆孔筛。

5.15 250 mL分液漏斗。

5.16 100 mL圆底烧瓶。

5.17 旋转蒸发仪。

[1]给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.18 pH计：精度为0.01。

5.19 250 mL具塞锥形瓶。

5.20 免疫亲和柱：针筒式 3 mL。

5.21 10 mL和50 mL一次性注射器。

5.22 固相萃取装置（带真空系统）。

5.23 一次性微孔滤头：带0.22 μm微孔滤膜（水相系）。

6 分析步骤

6.1 试液提取

6.1.1 乳：称取50 g(精确至0.01 g)混匀的试样，置于50 mL具塞离心管(5.7)中，在水浴(5.8) 中加热到35℃～37 ℃。在6000 转/分钟下离心15 min。收集全部上清液，供净化用。

6.1.2 发酵乳(包括固体状、半固体状和带果肉型)：称取50 g(精确至0.01 g)混匀的试样，用0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液(4.11)在酸度计(5.18)指示下调pH至7.4，在 9500 转/分钟下匀浆(5.4)5 min，以下按 6.1.1 进行操作。

6.1.3 乳粉和粉状婴幼儿配方食品：称取 10 g(精确至0.01 g)试样，置于250 mL 烧杯中。将50 mL 已预热到50 ℃的水加入到乳粉中，用玻璃棒将其混合均匀。如果乳粉仍未完全溶解，将烧杯置于50℃的水浴(5.8)中放置30 min。溶解后冷却至20 ℃，移入100 mL 容量瓶中，用少量的水分次洗涤烧杯，洗涤液一并移入容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀后分别移至两个50 mL离心管(5.7)中，在6000转/分钟下离心15 min，混合上清液，用移液管移取50mL上清液供净化处理用。

6.1.4 干酪：称取经切细、过10目圆孔筛混匀的试样5g(精确至0.01 g)，置于50 mL离心管(5 .7)中，加2 mL水和30 mL甲醇，在9500 转/分钟下匀浆5 min，超声提取30 min，在6000 转/分钟下离心15 min。收集上清液并移入250 mL分液漏斗中。在分液漏斗中加入30 mL石油醚（4.3），振摇2 min，待分层后，将下层移于50 mL烧杯中，弃去石油醚层。重复用石油醚提取2次。将下层溶液移到100 mL圆底烧瓶中，减压浓缩至约2 mL，浓缩液倒入离心管中，烧瓶用乙腈-水溶液(1+4)（4.7）5 mL分2次洗涤，洗涤液一并倒入50 mL离心管中，加水稀释至约50 mL，在6000 转/分钟下离心 5 min，上清液供净化处理。

6.1.5 奶油：称取5g(精确至0.01 g)试样，置于50 mL烧杯中，用20 mL石油醚(4.3)将其溶解并移于250mL具塞锥形瓶中。加20 mL水和30 mL甲醇，振荡30 min后，将全部液体移于分液漏斗中，待分层后，将下层溶液全部移到100 mL圆底烧瓶中，在旋转蒸发仪（5.17）中减压浓缩至约5 mL，加水稀释至约50 mL，供净化处理。

6.2 净化

6.2.1 免疫亲和柱的准备

将一次性的50 mL注射器筒与亲和柱(5.20)上顶部相串联，再将亲和柱与固相萃取装置连接起来。

注：根据免疫亲和柱的使用说明书要求，控制试液的pH值。

6.2.2 试样的纯化

将以上 6.1 试液提取液移至 50 mL 注射器筒(5.21)中，调节固相萃取装置的真空系统,控制试样以 2 mL/分钟～3 mL/分钟稳定的流速过柱。取下 50 mL 的注射器筒，装上 10 mL 注射器筒。注射器筒内加入水，以稳定的流速洗柱，然后，抽干亲和柱。脱开真空系统，在亲和柱下部放入 10 mL 刻度试管，上部装上另一个 10 mL 注射器筒，加入 4 mL 乙腈(4.2)，洗脱黄曲霉毒素 M_1，洗脱液收集在刻度试管中(5.11)中，洗脱时间不少于 60 秒。然后用氮气缓缓地在 30 ℃下将洗脱液蒸发至近干（如果蒸发至干，会损失黄曲霉毒素 M_1），用乙腈-水溶液（1+9）稀释至 1 mL。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.3 液相色谱参考条件

流动相：A 液，0.1% 甲酸溶液；B 液，乙腈-甲醇溶液（1+1）。

梯度洗脱：参见附录A中的表A.1。

流动相流动速度：0.3 mL/min。

柱温：35 ℃。

试液温度：20 ℃。

进样量：10 μL。

6.4 质谱参考条件

检测方式：多离子反应监测（MRM），详见表1中母离子、子离子和碰撞能量。扫描图参见附录A中的图A.1。

表1 离子选择参数表

黄曲霉毒素	母离子	定量子离子	碰撞能量	定性子离子	碰撞能量	离子化方式
M_1	329.0	273.5	22	259.5	22	ESI+

离子源控制条件：参见附录A中的表A.2。

6.5 定性

试样中黄曲霉毒素 M_1 色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围应在±2.5%之内。

黄曲霉毒素 M_1 的定性离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 3（S/N≥3），定量离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 10（S/N≥10）。

每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过表 2 规定的范围。

表 2 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	＞50%	＞20%至 50%	＞10%至 20%	≤10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

各检测目标化合物以保留时间和两对离子（特征离子对/定量离子对）所对应的 LC-MS/MS 色谱峰面积相对丰度进行定性。要求被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物的保留时间一致（一致的条件是偏差小于 20%），同时要求被测试样中目标化合物的两对离子对应 LC-MS/MS 色谱峰面积比与标准溶液中目标化合物的面积比一致。

6.6 试样测定

按照 6.3 和 6.4 确立的条件，测定试液（6.2）和标准系列溶液（4.14）中黄曲霉毒素 M_1 的离子强度，外标法定量。色谱图见附录 A 的图 A.2。

色谱参考保留时间：黄曲霉毒素 M_1 3.23 min。

6.7 空白试验

不称取试样，按6.5的步骤做空白实验。应确认不含有干扰被测组分的物质。

6.8 标准曲线绘制

食品伙伴网http://www.foodmate.net

将标准系列溶液（4.14）由低到高浓度进样检测，以峰面积-浓度作图，得到标准曲线回归方程。

6.9 定量测定

待测样液中被测组分的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围时，则应将样液用空白基质溶液稀释后重新进样分析或减少取样量，重新按6.1进行处理后再进样分析。

7 分析结果的表述

外标法定量，按式（1）计算黄曲霉毒素M_1的残留量。

$$X = \frac{A \times V \times f \times 1}{m} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中黄曲霉毒素 M_1 的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

A——试样中黄曲霉毒素 M_1 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V——样品定容体积，单位毫升（mL）；

f——样液稀释因子；

m——试样的称样量，单位克（g）。

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

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。

第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

9 原理

亲和柱内含有的黄曲霉毒素 M_1 特异性单克隆抗体交联在固体支持物上，当试样通过亲和柱时，抗体选择性的与黄曲霉毒素 M_1(抗原)键合，形成抗体—抗原复合体。用水洗柱除去柱内杂质，然后用洗脱剂洗脱吸附在柱上的黄曲霉毒素 M_1，收集洗脱液。用带有荧光检测器的高效液相色谱仪测定洗脱液中黄曲霉毒素 M_1 含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 免疫亲和柱：亲和柱的最大容量不小于100 ng黄曲霉毒素M_1(相当于50 mL浓度为2 μg/L的试样)，当标准溶液含有4 ng黄曲霉毒素M_1(相当于50 mL浓度为80 ng/L的试样)时回收率不低于80 %。应该定期检查亲和柱的柱效和回收率，对于每个批次的亲和柱至少检查一次(见10.1.1和10.1.2)。

10.1.1 柱效检查

用移液管(11.4)移取 1.0 mL 的黄曲霉毒素 M_1 标准储备液(10.5.2)到 20 mL 的锥形试管中(11.9)。用恒流的氮气(10.3)将液体慢慢吹干，然后用 10 mL l0 %的乙腈水溶液(10.2.2)溶解残渣，用力摇荡。

将该溶液加入到 40 mL 的水中，充分混匀，全部通过免疫亲和柱（10.1）。按说明书要求使用免疫亲和柱。淋洗免疫亲和柱后，洗脱黄曲霉毒素 M_1。将洗脱液进行适当稀释后，用高效液相色谱仪测定免疫亲和柱键合的黄曲霉毒素 M_1 含量。

计算黄曲霉毒素 M_1 的回收率，将其结果与 10.1 中所要求的指标进行比较。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

10.1.2 回收率检查

用移液管(11.4)移取 0.8 mL 0.005 μg/mL 的黄曲霉毒素 M_1 标准工作液(10.5.3)到 10 mL 的水中，充分混匀，全部通过免疫亲和柱。按说明书使用免疫亲和柱。淋洗免疫亲和柱，洗脱下黄曲霉毒素 M_1。将洗脱液进行适当稀释后，用高效液相色谱仪测定免疫亲和柱键合的黄曲霉毒素 M_1 含量。计算黄曲霉毒素 M_1 的回收率，将其结果与 10.1 中所要求的指标进行对比。

10.2 乙腈(CH_3CN)：色谱纯。

10.2.1 25 %乙腈水溶液：将250 mL的乙腈(10.2)与750 mL的水混溶(使用前需要脱气)。

10.2.2 10 %乙腈水溶液：将100 mL的乙腈(10.2)与900 mL的水混溶(使用前需要脱气)。

10.3 氮气（N_2）。

10.4 三氯甲烷：加入0.5 %～1.0 %质量比(与三氯甲烷质量比)的乙醇进行稳定。

10.5 黄曲霉毒素M_1标准溶液，纯度≥98%。

10.5.1 浓度的校正

黄曲霉毒素 M_1 三氯甲烷标准溶液浓度为 10 μg/mL。根据下面的方法，在最大吸收波段处测定溶液的吸光度，以确定黄曲霉毒素 M_1 的实际浓度。

用分光光度计（11.11）在 340 nm～370 nm 处测定，扣除三氯甲烷的空白本底，读取标准溶液的吸光度值。在接近 360 nm 最大吸收波段 λ_{max} 处，测得吸光度值为 A，根据式（2）计算浓度值：

$$c_i = \frac{A \times M \times 100}{\varepsilon} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

c_i——黄曲霉毒素 M_1 实际浓度，单位为微克每毫升（μg/mL)；

A——在 λ_{max} 处测得的吸光度值；

M——328 g/mol，黄曲霉毒素 M_1 摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol)；

ε——19950，溶于三氯甲烷中的黄曲霉毒素 M_1 的吸光系数，单位为平方米每摩尔（m^2/mol)。

10.5.2 标准储备液

确定黄曲霉毒素 M_1 标准溶液的实际浓度值后（10.5.1），继续用三氯甲烷将其稀释为浓度为 0.1 μg/mL 的储备液。储备液密封后于冰箱中 5 ℃以下避光保存。在此条件下，储备液可以稳定两个月。

10.5.3 黄曲霉毒素M_1标准工作液

从冰箱中取出标准储备液（10.5.2）放置至室温，移取一定量的储备液进行稀释制备成工作液。工作液临用前配制。

黄曲霉毒素 M_1 标准工作液配制：用移液管（11.4）准确移取 1.0 mL 的储备液（10.5.2）到 20 mL 的锥形试管中（11.9)，用和缓的氮气（10.3）将溶液吹干，然后用 20.0 mL10 %的乙腈水溶液（10.2.2）将残渣重新溶解，30 min 内振摇，混匀，配成浓度为 0.005 μg/mL 的黄曲霉毒素 M_1 标准工作液。在用氮气对储备液吹干的过程中，一定要仔细操作，避免因温度降低太多而出现结露。

在作标准曲线时，黄曲霉毒素 M_1 的进样绝对含量分别是 0.05 ng、0.1 ng、0.2 ng、0.4 ng。根据高效液相色谱仪进样环的容积量，用工作液配置一系列适当浓度的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液，稀释液用 10 %乙腈水溶液（10.2.2）。

11 仪器和设备

11.1 一次性注射器：10 mL和50 mL。

11.2 真空系统。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

11.3 离心机：转速≥7000 转/分钟。

11.4 移液管：1.0 mL、2.0 mL和50.0 mL。

11.5 玻璃烧杯：250 mL。

11.6 容量瓶：100 mL。

11.7 水浴：温控30 ℃± 2℃，50 ℃±2 ℃，温度范围36℃±1 ℃。

11.8 滤纸：中速定性滤纸。

11.9 带刻度的磨口锥形玻璃试管：5 mL、10 mL、20 mL。

11.10 高效液相色谱仪

11.10.1 无脉冲泵：适合恒定体积流量约1 mL/min的泵。
11.10.2 进样系统：具有固定或可变容积的进样环，进样体积50 μL～500 μL。
11.10.3 反相色谱柱：填充3 μm或者5 μm的十八烷基硅胶，加有填充反相材料的保护柱。
11.10.4 荧光检测器：具有365 nm激发波长、435 nm发射波长，在适当的色谱条件下能够测定0.02 ng的黄曲霉毒素M_1(相当于5倍噪音)。

11.11 紫外分光光度计：波长范围为200 nm～400 nm。

11.12 天平：感量为0.01 g。

12 分析步骤

所有的操作分析均应在避光条件下进行。

12.1 试样制备

12.1.1 乳：将试样在水浴（11.7）中加热到35℃～37℃。用滤纸（11.8）过滤（根据情况，可以使用多层滤纸进行过滤），或者在7000 转/分钟离心15 min。至少收集50 mL试样，按照12.4继续操作。
12.1.2 乳粉：称取10 g样品（精确到0.1 g），置于250 mL的烧杯（11.5）中。将50 mL已预热到50℃的水多次少量地加入到乳粉中，用搅拌棒将其混合均匀。如果乳粉不能完全溶解，将烧杯在50℃的水浴（11.7）中放置至少30 min,仔细混匀。将溶解的乳粉冷却至20℃后，移入100 mL容量瓶（11.6）中，用少量的水分次淋洗烧杯，淋洗液一并移入容量瓶中，再用水定容至刻度。用滤纸（11.8）过滤乳，或者在7000转/分钟下离心15 min。至少收集50 mL的乳试样，按照12.4继续进行分析。
12.1.3 发酵乳：按照“第一法”中6.1.2的前处理方法进行。
12.1.4 干酪：按照“第一法”中6.1.4的前处理方法进行。
12.1.5 奶油：按照“第一法”中6.1.5的前处理方法进行。

12.2 免疫亲和柱的准备

将一次性的 50 mL 注射器筒（11.1）与亲和柱（10.1）的顶部相连，再将亲和柱与真空系统（11.2）连接起来。

12.3 试样的提取与纯化

用移液管移取 50 mL 试样（12.1.1 或 12.1.2）到 50 mL 注射器（11.1）中，调节真空系统（11.2），控制试样以 2 mL/min～3 mL/min 稳定的流速过柱。

取下 50 mL 的注射器，装上 10 mL 注射器。注射器内加入 10 mL 水，以稳定的流速洗柱，然后，

食品伙伴网http://www.foodmate.net

抽干亲和柱。

脱开真空系统，装上另一个 10 mL 注射器，加入 4 mL 乙腈(10.2)。缓缓推动注射器栓塞，通过柱塞控制流速，洗脱黄曲霉毒素 M_1，洗脱液收集在锥形管(11.9)中，洗脱时间不少于 60 s。然后用和缓的氮气(10.3)在 30 ℃下将洗脱液蒸发至体积为 50 μL～500 μL(如果蒸发至干，会损失黄曲霉毒素 M_1)。再用水稀释 10 倍至最终体积为 V_f(即 500 μL～5000 μL)。

注：如果注入高效液相色谱仪含黄曲霉毒素 M_1 的样品，乙腈含量超过 10%，色谱峰变宽。如果水含量超过 90 %，则对色谱峰的形状没有影响。

12.4 高效液相色谱分析

12.4.1 色谱条件

色谱柱：C_{18}，长25 cm，内径4.6 mm；

流动相：25 %乙腈水溶液(10.2.1)；

流速：1 mL/min。

12.4.2 黄曲霉毒素M_1的标准曲线

根据高效液相色谱仪进样环容积，选择适当进样体积数 V_i，分别注入含有 0.05 ng、0.1 ng、0.2 ng 和 0.4 ng 的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。绘制成峰面积或峰高对黄曲霉毒素 M_1 质量的标准曲线。

12.4.3 色谱分析

根据样品洗脱液色谱图中黄曲霉毒素 M_1 的峰高或峰面积值，从标准曲线上得出样品洗脱液中所含有的黄曲霉毒素 M_1 质量数(ng)。

如果样品洗脱液的黄曲霉毒素 M_1 的峰面积或峰高值高于标准曲线范围，用水定容稀释样品洗脱液后，重新进样分析。

13 分析结果的表述

13.1 乳

应用式(3)计算被测样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量 ω_m。

$$\omega_m = \frac{m_A \times V_f \times 1}{V_i \times V} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

ω_m——黄曲霉毒素 M_1 的含量，单位为微克每升(μg/L)；

m_A——样品洗脱液黄曲霉毒素 M_1 的峰面积或峰高从标准曲线上得出的黄曲霉毒素 M_1 的质量，单位为纳克(ng)；

V_i——样品洗脱液的进样体积，单位为微升(μL)；

V_f——样品洗脱液的最终体积，单位为微升(μL)；

V——通过免疫亲和柱被测样品的体积，单位为毫升(mL)。

式(3)适用于未经稀释的试样，否则应该乘以稀释倍数。

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

13.2 乳粉

应用式(4)计算被测样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量 ω_p。

$$\omega_p = \frac{m_A \times V_f \times 1}{V_i \times m} \quad \cdots\cdots (4)$$

食品伙伴网http://www.foodmate.net

式中：

ω_p——黄曲霉毒素 M_1 的含量，单位为微克每千克(μg/kg)；

m——50mL 样液(12.3)中所含乳粉质量，单位为克(g)。

m_A、V_f、V_i 的含义与 13.1 中所定义的一样。

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

14 精密度

各实验室试验结果的精密度总结于附录 B 中，这些数据不适用于其他的污染水平和被测样。

第三法 免疫层析净化荧光分光度法

15 原理

试样经过离心、脱脂、过滤，滤液经含有黄曲霉毒素M_1特异性单克隆抗体的免疫亲和柱层析净化，黄曲霉毒素M_1交联在层析介质中的抗体上。此抗体对黄曲霉毒素M_1具有专一性，当样品通过亲和柱时，抗体选择性的与所有存在的黄曲霉毒素M_1(抗原)键合。用甲醇-水(1+9)将免疫亲和柱上杂质除去，以甲醇-水(8+2)通过免疫亲和柱洗脱，将溴溶液衍生后的洗脱液置于荧光光度计中测定黄曲霉毒素M_1含量。

16 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

16.1 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

16.2 氯化钠(NaCl)。

16.3 甲醇-水(1+9)：取10 mL甲醇加入90 mL水。

16.4 甲醇-水(8+2)：取80 mL甲醇加入20 mL水。

16.5 溴溶液储备液(0.01 %)：称取适量溴，溶于水后，配成0.01%的储备液，避光保存。

16.6 溴溶液工作液(0.002 %)：取10 mL0.01 %的溴溶液储备液加入40 mL水混匀，于棕色瓶中保存备用。现用现配。

16.7 二水硫酸奎宁[$(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$]。

16.8 硫酸溶液(0.05 mol/L)：取2.8 mL浓硫酸，缓慢加入适量水中，冷却后定容至1000 mL。

16.9 荧光光度计校准溶液：称取0.340 g 二水硫酸奎宁，用0.05 mol/L硫酸溶液（16.8）溶解并定容至100 mL，此溶液荧光光度计读数相当于2.0 μg/L黄曲霉毒素M_1标准溶液。0.05 mol/L硫酸溶液（16.8）荧光光度计读数相当于0.0 μg/L黄曲霉毒素M_1。

17 仪器和设备

17.1 荧光光度计。

17.2 离心机：转速≥7000 转/分钟。

17.3 玻璃纤维滤纸：直径 11 cm，孔径1.5 μm。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

17.4 黄曲霉毒素M_1免疫亲和柱。

17.5 空气压力泵。

17.6 玻璃试管:直径12 mm，长75 mm，无荧光特性。

17.7 玻璃注射器：10 mL。

18 分析步骤

18.1 试样提取

18.1.1 乳：取 50.0 mL试样，加入1.0 g氯化钠（16.2），7000转/分钟下离心10 min，小心移取用于分析的乳底脱脂层，不要碰触顶部脂肪层，将脱脂的乳以玻璃纤维滤纸（17.3）过滤，滤液备用。

18.1.2 乳粉：称取 5 g 试样(精确至0.01 g)，用30 ℃～60 ℃水将其慢慢溶解，定容至50 mL，加入1.0 g氯化钠（16.2），以下按18.2的步骤操作。

18.2 净化

将免疫亲和柱（17.4）连接于10 mL玻璃注射器（17.7）下。准确移取10.0 mL上述滤液（18.1）注入玻璃注射器中，将空气压力泵（17.5）与注射器连接，调节压力使溶液以约6 mL/min流速缓慢通过免疫亲和柱（17.4），直至2 mL～3 mL空气通过柱体。以10 mL甲醇-水(1+9)（16.3）清洗柱子两次，弃去全部流出液，并使2 mL～3 mL空气通过柱体。准确加入1.0 mL(V_1)甲醇-水(8十2)（16.4）洗脱液洗脱，流速为1 mL/min～2 mL/min，收集全部甲醇-水洗脱液于玻璃试管（17.6）中，备用。

18.3 测定

18.3.1 荧光光度计校准

在激发波长360 nm，发射波长450 nm条件下，以0.05 mol/L的硫酸溶液（16.8）为空白，调节荧光光度计的读数值为 0.0 μg/L； 以荧光光度计校准溶液（16.9）调节荧光光度计的读数值2.0 μg/L。

18.3.2 样液测定

取上述洗脱液加入1.0 mL（V）0.002 %溴溶液，1 min后立即于荧光光度计测定样液中黄曲霉毒素M_1含量c_1。

18.3.3 空白试验

用水代替试样，按18.1～18.3 步骤做空白试验。

19 分析结果的表述

19.1 乳

乳检测结果按式(5)计算:

$$X_1 = \frac{(C_1 - C_0) \times V_1 \times 10}{V} \quad \cdots\cdots (5)$$

式中:

X_1——试样中黄曲霉毒素M_1含量，单位为微克每升(μg/L)；

C_1——荧光光度计中读取的样液中黄曲霉毒素M_1的浓度，单位为微克每升(μg/L)；

C_0——荧光光度计中读取的空白试验中黄曲霉毒素M_1的浓度，单位为微克每升(μg/L)；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

V_1——最终净化甲醇-水（8+2）洗脱液体积，单位为毫升(mL)；

V——通过亲和柱试样体积，单位为毫升(mL)；

10——仪器的读数系数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留到小数点后一位。

19.2 乳粉

乳粉检测结果按式(6)计算:

$$X_2 = \frac{(C_2 - C_0) \times V_1 \times 10 \times V}{m} \quad \cdots\cdots (6)$$

式中:

X_2——试样中黄曲霉毒素M_1含量，单位为微克每千克(μg/kg)；

C_2——荧光光度计中读取的样液中黄曲霉毒素M_1的浓度，单位为微克每升（μg/L)；

C_0——荧光光度计中读取的空白试验中黄曲霉毒素M_1的浓度，单位为微克每升（μg/L)；

V_1——最终净化甲醇-水(8+2)洗脱液体积，单位为毫升(mL)；

V——通过亲和柱试样体积，单位为毫升(mL)；

m——50 mL试样中所含乳粉的质量，单位为克每毫升(g/mL)；

10——仪器的读数系数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留到小数点后一位。

第四法　双流向酶联免疫法

20　原理

利用酶联免疫竞争原理，样品中残留的黄曲霉毒素M_1与定量特异性酶标抗体反应，多余的游离酶标抗体则与酶标板内的包被抗原结合，通过流动洗涤，加入酶显色底物显色后，与标准点比较定性。

21　试剂和材料

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

21.1 黄曲霉毒素M_1双流向酶联免疫试剂盒，2 ℃～7 ℃保存。

21.1.1 黄曲霉毒素M_1系列标准溶液。

21.1.2 酶联免疫试剂颗粒（含特异性酶标抗体)。

21.1.2.1 抗黄曲霉毒素M_1抗体。

警告：不应破损，否则立即销毁。

21.1.2.2 酶结合物。

21.1.3 酶显色底物。

22　仪器和设备

22.1 样品试管，带有密封盖，内置酶联免疫试剂颗粒（21.1.2)。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

22.2 移液器（管），450 μL±50 μL。

22.3 酶联免疫检测加热器，40℃±5℃。

22.4 双流向酶联免疫检测读数仪。

23 分析步骤

23.1 加热器（22.3）预热到45 ℃±5 ℃，并至少保持15 min。

23.2 液体试样或乳粉试样复原后振摇混匀，移取450 μL至样品试管（22.1）中，充分振摇，使其中的酶联免疫试剂颗粒（21.1.2）完全溶解。

23.3 将样品试管（22.1）和酶联免疫检测试剂盒（21.1）同时置于预热过的加热器内保温，保温时间5 min～6 min。使试样中的黄曲霉毒素M_1和酶联免疫试剂颗粒中的酶标记黄曲霉毒素M_1抗体结合。

23.4 将样品试管内的全部内容物倒入试剂盒（21.1）的样品池中，样品将流经“结果显示窗口”向绿色的激活环流去。

23.5 当激活环的绿色开始消失变为白色时，立即用力按下激活环按键。

23.6 试剂盒（21.1）继续放置在加热器（22.3）中保温保持4 min，使显色反应完成。

23.7 将试剂盒从加热器中取出水平放置，立即进行检测结果判读，结果判读应在1 min内完成。

24 分析结果的表述

24.1 目测判读结果

试样点的颜色深于质控点，或两者颜色相当，检测结果为阴性。
试样点的颜色浅于质控点，检测结果为阳性。

24.2 双流向酶联免疫检测读数仪判读结果

数值≤1.05，显示Negative，检测结果为阴性。
数值＞1.05，显示Positive，检测结果为阳性。
注：阳性样品需用第一法定量检测方法进一步确认。

25 其他

本标准第一法的定量限为 0.01 μg/kg（以乳计）；第二法乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的最低检测限为 0.08 μg/kg，乳中黄曲霉毒素 M_1 的最低检测限为 0.008 μg/L；第三法乳中的黄曲霉毒素 M_1 的检出限为 0.1 μg/L，乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的检出限为 0.1 μg/kg；第四法的检出限为 0.5 μg/kg。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录A
（资料性附录）
黄曲霉毒素 M_1 免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法色谱图及参考条件

A.1 黄曲霉毒素 M_1 免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法色谱图及参考条件

免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法黄曲霉毒素 M_1 子离子扫描图见图 A.1。
免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法黄曲霉毒素 M_1 色谱质谱图见图 A.2。
免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法液相色谱梯度洗脱条件见表 A.1。
免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法离子源控制条件见表 A.2。

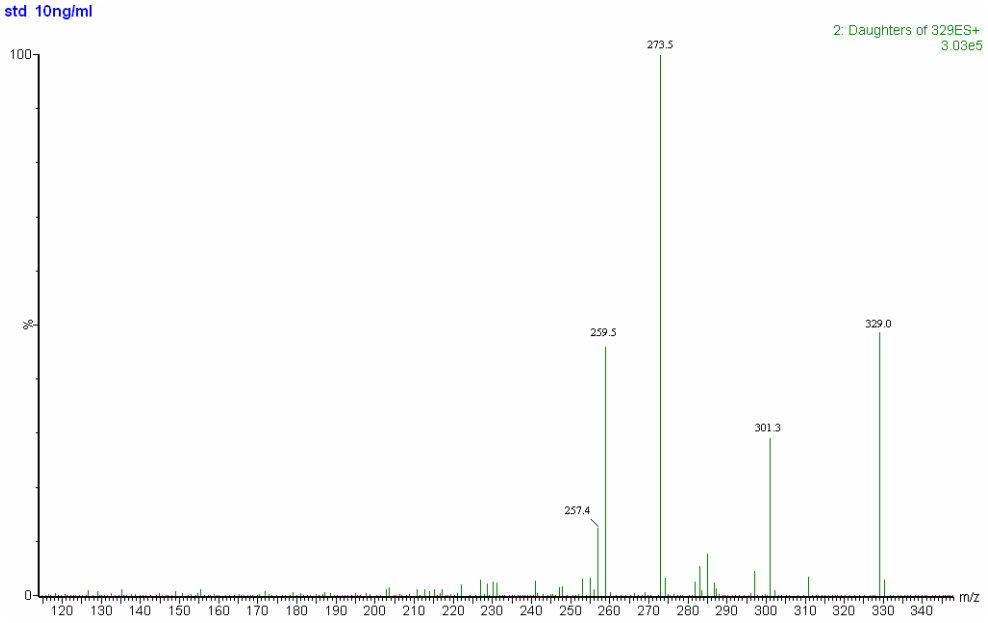


图 A.1 黄曲霉毒素 M_1 子离子扫描图

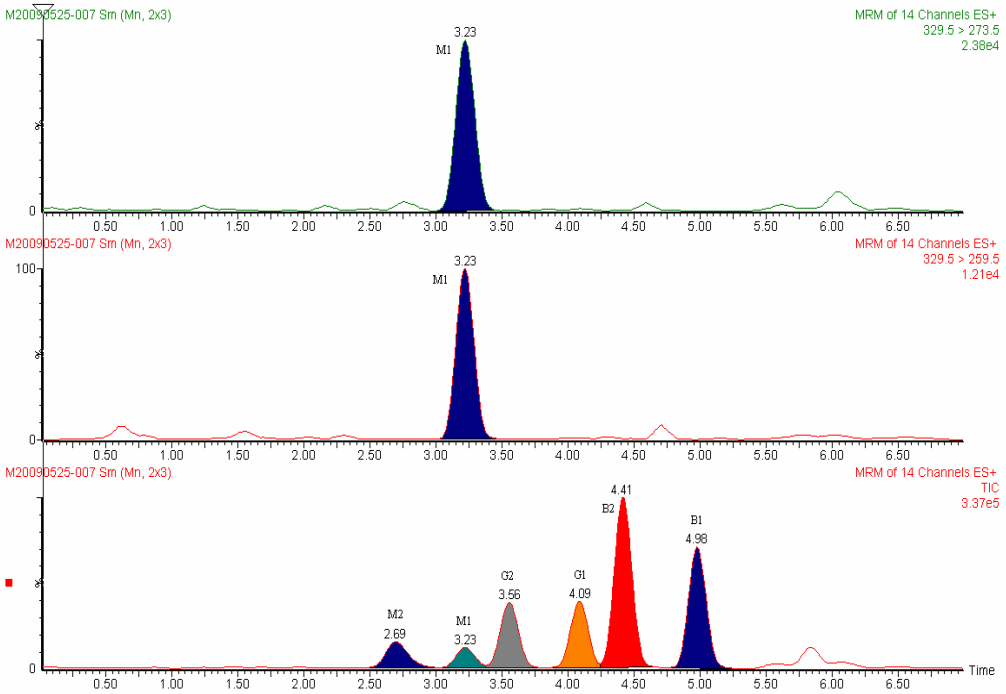


图 A.2 黄曲霉毒素 M_1 色谱质谱图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 A.1 液相色谱梯度洗脱条件

时间（min）	流动相 A%	流动相 B%	梯度变化曲线
0	68.0	32.0	-
4.2 0	55.0	45.0	6
5.0 0	0.0	100.0	6
5.7 0	0.0	100.0	1
6.0 0	68.0	32.0	6
注:1为即时变化,6为线性变化。			

表 A.2 离子源控制条件

电离方式	电喷雾电离，负离子
毛细管电压（kV）	3.5
锥孔电压（V）	45
射频透镜1电压（V）	12.5
射频透镜2电压（V）	12.5
离子源温度（℃）	120
锥孔反吹气流量（L/h）	50
脱溶剂气温度（℃）	350
脱溶剂气流量（L/h）	500
电子倍增电压（V）	650

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 B
（资料性附录）
多个不同实验室的试验结果

世界各地 16 个实验室参加了低脂肪(1%)和高脂肪(28 %)乳粉样品的协同试验。高脂肪样品是用于制作参比物质的剩留物，所以黄曲霉毒素 M_1 的含量是已知的。

对于乳粉，其污染水平为 0.08 μg/kg～0.6 μg/kg，即对于乳而言，污染水平为 8 ng / L～60 ng /L。

试验结果根据 ISO 5725-l 和 ISO 5725-2 规定的统计方法获得，其精密度的数据列于表 B.1。

表 B.1 精密度数据

样品编号	1	2	3	4	5
实验室个数[a]	12	4	13	11	14
平均值/(ng/kg)	81	150	80	202	580
重复性值 r/(ng/kg)	23	60.1	15	27	203
再现性值 R/(ng/kg)	52	98	41	61	310
重复性变异系数/(%)	9.9	14.0	6.8	4.7	12.5
复验性变异系数/(%)	23	22.7	18.3	10.8	19.1
[a] 减少的实验室数是根据 Cochran 和 Grubbs 统计方法应该从样本中剔除的数据					

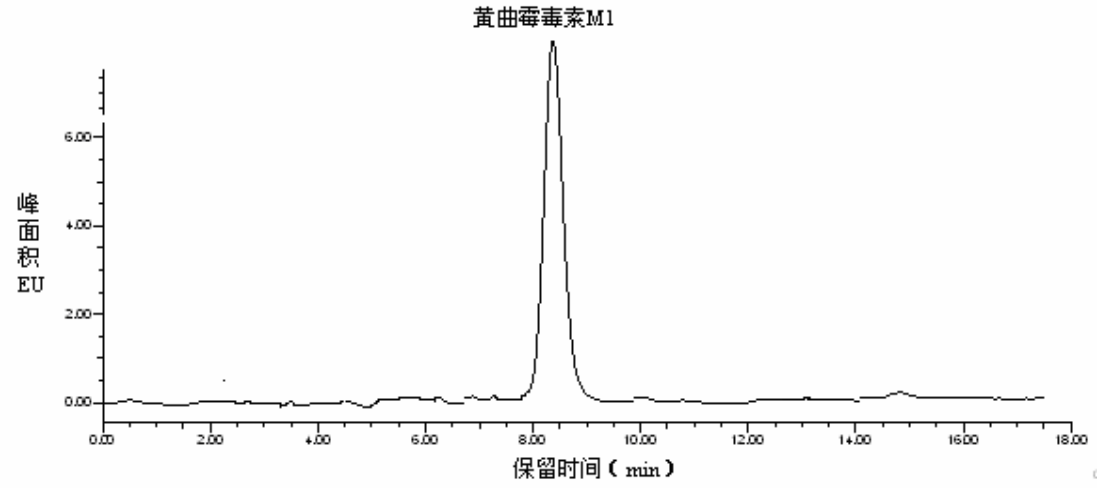


图 B.1 高效液相色谱分离黄曲霉毒素M_1的标准图

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.38—2010

食品安全国家标准
生乳冰点的测定

National food safety standard

Determination of freezing point in raw milk

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准非等效采用国际标准ISO 5764/IDF 108-2002（Milk-Determination of freezing point- thermistor cryoscope method(reference method))。

本标准系首次发布。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
生乳冰点的测定

1 范围

本标准规定了热敏电阻冰点仪测定生乳冰点的基准方法。

本标准适用于生乳冰点的测定。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

生乳冰点 FPD（freezing point depression）

使用本标准规定测得的数值为原料乳的冰点，单位以摄氏千分之一度（m℃）表示。

4 原理

样品管中放入一定量的乳样，置于冷阱中，于冰点以下制冷。当被测乳样制冷到－3 ℃时，进行引晶，结冰后通过连续释放热量，使乳样温度回升至最高点。并在短时间内保持恒定，为冰点温度平台，该温度即为该乳样的冰点值。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 氯化钠（NaCl）：磨细后置于干燥炉中，130 ℃± 5 ℃干燥 24 h 以上，于干燥器中冷却至室温。

5.2 乙二醇（$C_2H_6O_2$）。

5.3 校准液

选择两种不同冰点的氯化钠标准溶液，氯化钠标准溶液与被测牛奶样品的冰点值相近，且所选择的两份氯化钠标准溶液的冰点值之差不得少于100 m℃，见表1。

5.3.1 校准液 A（20 ℃～25℃室温下）：称取 6.731 g（精确至 0.0001 g）氯化钠（5.1），溶于少量水中，定容至 1000 mL 容量瓶中。其冰点值为－0.400 ℃。

5.3.2 校准液 B：20 ℃室温下：称取 9.422 g（精确至 0.0001 g）氯化钠（5.1），溶于少量水中，定容至 1000 mL 容量瓶中。其冰点值为－0.557 ℃。

5.4 冷却液

准确量取 330 mL 乙二醇（5.2）于 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度并摇匀，其体积比分数为 33 %。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　氯化钠标准溶液的冰点（20 ℃）

氯化钠溶液（g/L ）	氯化钠溶液（g/kg ）	冰点（m℃）
6.731	6.763	−400.0
6.868	6.901	−408.0
7.587	7.625	−450.0
8.444	8.489	−500.0
8.615	8.662	−510.0
8.650	8.697	−512.0
8.787	8.835	−520.0
8.959	9.008	−530.0
9.130	9.181	−540.0
9.302	9.354	−550.0
9.422	9.475	−557.0
10.161	10.220	−600.0

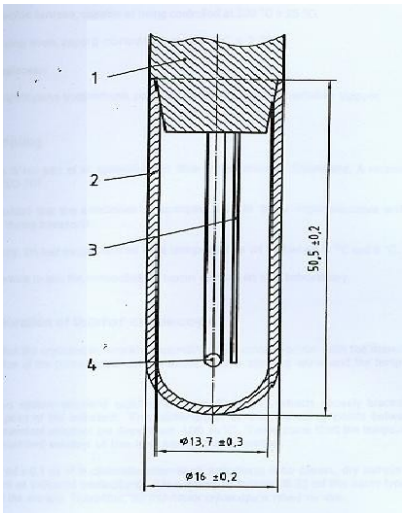
6　仪器和设备

6.1　天平：感量为 0.1 mg。

6.2　热敏电阻冰点仪：带有热敏电阻控制的冷却装置（冷阱），热敏电阻探头，搅拌器和引晶装置（见图 1）及温度显示仪。

6.2.1　检测装置，温度传感器和相应的电子线路

温度传感器为直径为 1.60 mm±0.4 mm 的玻璃探头，在 0 ℃时的电阻在 3 Ω 和 30 kΩ 之间。当探头在测量位置时，热敏电阻的顶部应位于样品管的中轴线，且顶部离内壁与管底保持相等距离（见图 1）。温度传感器和相应的电子线路在−400 m℃至−600 m℃之间测量分辨率为 1 m℃或更好。



1.顶杆 2.样品管 3.搅拌金属棒 4.热敏探头

图 1 热敏电阻冰点仪检测装置

仪器正常工作时，此循环系统在−400 m℃到−600 m℃范围之间任何一个点的线性误差应不超过 1 m℃。

6.2.2　搅拌金属棒：耐腐蚀，在冷却过程中搅拌测试样品。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

搅拌金属棒应根据相应仪器的安放位置来调整振幅。正常搅拌时金属棒不得碰撞玻璃传感器或样品管壁。

6.2.3 引晶装置：操作时，测试样品达到－3.0 ℃时启动引晶的机械振动装置

在引晶时使搅拌金属棒在 1 s～2 s 内加大振幅，使其碰撞样品管壁。

6.3 样品管：硼硅玻璃，长度 50.5 mm±0.2 mm，外部直径为 16.0 mm±0.2 mm，内部直径为 13.7 mm±0.3 mm。

6.4 称量瓶。

6.5 容量瓶：1000 mL。

6.6 烘箱：温度可控制在 150 ℃±5 ℃。

6.7 干燥器。

6.8 移液器：1 mL～5 mL。

7 分析步骤

7.1 试样制备

测试样品要保存在 0 ℃到 6 ℃的冰箱中，样品抵达实验室时立即检测效果最好。测试前样品温度到达室温，且测试样品和氯化钠标准溶液测试时的温度应一致。

7.2 仪器预冷

开启冰点仪，等待冰点仪传感探头升起后，打开冷阱盖，按生产商规定加入相应体积冷却液（5.4），盖上盖子，冰点仪进行预冷。预冷30 min后，开始测量。

7.3 常规仪器校准

7.3.1 A 校准

用移液器分别吸取2.20 mL校准液A（5.3.1），依次放入三个样品管中，在启动后的冷阱中插入装有校准液A（5.3.1）的样品管。当重复测量值在－0.400 ℃±0.0020 ℃校准值时，完成校准。

7.3.2 B 校准

用移液器分别吸取 2.20 mL 校准液 B（5.3.2），依次放入三个样品管中，在启动后的冷阱中插入装有校准液 B（5.3.2）的样品管。当重复测量值在－0.557 ℃±0.0020 ℃校准值时，完成校准。

7.4 样品测定

将样品2.20 mL转移到一个干燥清洁的样品管中，将待测样品管放到仪器上的测量孔中。冰点仪的显示器显示当前样品温度，温度呈下降趋势，测试样品达到－3.0 ℃时启动引晶的机械振动，搅拌金属棒开始振动引晶，温度上升，当温度不再发生变化时，冰点仪停止测量，传感头升起，显示温度即为样品冰点值。

测试结束后，应保证探头和搅拌金属棒清洁、干燥，必要时，可用柔软洁净的纱布仔细擦拭。

如果引晶在达到－3.0 ℃之前发生，则该测定作废，需重新取样。测定结束后，移走样品管，并用水冲洗温度传感器和搅拌金属棒并擦拭干净。

每一样品至少进行两次平行测定，绝对差值≤4 m℃时，可取平均值作为结果。

8 分析结果的表述

食品伙伴网http://www.foodmate.net

如果常规校准检查的结果证实仪器校准的有效性，则取两次测定结果的平均值，保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过4 m℃。

10 其他

本标准的方法检出限为 2 m℃。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5413.39—2010

食品安全国家标准
乳和乳制品中非脂乳固体的测定

National food safety standard

Determination of nonfat total milk solids in milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替 GB 5409-85《牛乳检验方法》、GB/T 5416-85《奶油检验方法》。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5409-85；

——GB/T 5416-85。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
乳和乳制品中非脂乳固体的测定

1 范围

本标准规定了生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳中非脂乳固体的测定方法。

本标准适用于生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳中非脂乳固体的测定。

2 规范性引用文件

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

3 原理

先分别测定出乳及乳制品中的总固体含量、脂肪含量（如添加了蔗糖等非乳成分含量，也应扣除），再用总固体减去脂肪和蔗糖等非乳成分含量，即为非脂乳固体。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 平底皿盒：高 20 mm～25 mm，直径 50 mm～70 mm 的带盖不锈钢或铝皿盒，或玻璃称量皿。

4.2 短玻璃棒：适合于皿盒的直径，可斜放在皿盒内，不影响盖盖。

4.3 石英砂或海砂：可通过 500 μm 孔径的筛子，不能通过 180 μm 孔径的筛子，并通过下列适用性测试：将约 20 g 的海砂同短玻棒一起放于一皿盒中，然后敞盖在 100 ℃±2 ℃的干燥箱中至少烘 2 h。把皿盒盖盖后放入干燥器中冷却至室温后称量，准确至 0.1 mg。用 5 mL 水将海砂润湿，用短玻棒混合海砂和水，将其再次放入干燥箱中干燥 4 h。把皿盒盖盖后放入干燥器中冷却至室温后称量，精确至 0.1 mg，两次称量的差不应超过 0.5 mg。如果两次称量的质量差超过了 0.5 mg，则需对海砂进行下面的处理后，才能使用：

将海砂在体积分数为 25 %的盐酸溶液中浸泡 3d，经常搅拌。尽可能地倾出上清液，用水洗涤海砂，直到中性。在 160 ℃条件下加热海砂 4 h。然后重复进行适用性测试。

5 仪器和设备

5.1 天平：感量为 0.1 mg。

5.2 干燥箱。

5.3 水浴锅。

6 分析步骤

6.1 总固体的测定

食品伙伴网http://www.foodmate.net

在平底皿盒（4.1）中加入 20 g 石英砂或海砂（4.3），在 100 ℃±2 ℃的干燥箱中干燥 2 h，于干燥器冷却 0.5 h，称量，并反复干燥至恒重。称取 5.0 g（精确至 0.0001 g）试样于恒重的皿内，置水浴上蒸干，擦去皿外的水渍，于 100 ℃±2 ℃干燥箱中干燥 3 h，取出放入干燥器中冷却 0.5 h，称量，再于 100 ℃±2 ℃干燥箱中干燥 1 h，取出冷却后称量，至前后两次质量相差不超过 1.0 mg。试样中总固体的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100 \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X——试样中总固体的含量，单位为克每百克（g/100g）；

m_1——皿盒、海砂加试样干燥后质量，单位为克（g）；

m_2——皿盒、海砂的质量，单位为克（g）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

6.2 脂肪的测定（按 GB 5413.3 中规定的方法测定）。

6.3 蔗糖的测定（按 GB 5413.5 中规定的方法测定）。

7 分析结果的表述

$$X_{NFT} = X - X_1 - X_2 \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

X_{NFT}——试样中非脂乳固体的含量，单位为克每百克（g/100g）；

X——试样中总固体的含量，单位为克每百克（g/100g）；

X_1——试样中脂肪的含量，单位为克每百克（g/100g）；

X_2——试样中蔗糖的含量，单位为克每百克（g/100g）。

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 5420—2010

食品安全国家标准

干 酪

National food safety standard

Cheese

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准 Codex Stan 283-1978（Revision 1999, Amendment 2006, 2008）Codex General Standard for Cheese，本标准与 Codex Stan 283-1978（Revision 1999, Amendment 2006，2008)的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 5420-2003《干酪卫生标准》以及 GB/T 21375-2008《干酪(奶酪)》中的部分指标，GB/T 21375-2008《干酪(奶酪)》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与 GB 5420-2003 相比，主要变化如下：

——标准名称改为《干酪》；

——修改了“范围”的描述；

——增加了“术语和定义”；

——删除了“理化指标”；

——“污染物限量”直接引用 GB 2762 的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用 GB 2761 的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——“微生物限量”中增加了单核细胞增生李斯特氏菌指标；

——增加了对营养强化剂的要求。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5420-1985、GB 5420-2003。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

干 酪

1 范围

本标准适用于成熟干酪、霉菌成熟干酪和未成熟干酪。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 干酪 cheese

成熟或未成熟的软质、半硬质、硬质或特硬质、可有涂层的乳制品，其中乳清蛋白/酪蛋白的比例不超过牛奶中的相应比例。干酪由下述方法获得：

a）在凝乳酶或其它适当的凝乳剂的作用下，使乳、脱脂乳、部分脱脂乳、稀奶油、乳清稀奶油、酪乳中一种或几种原料的蛋白质凝固或部分凝固，排出凝块中的部分乳清而得到。这个过程是乳蛋白质(特别是酪蛋白部分)的浓缩过程，即干酪中蛋白质的含量显著高于所用原料中蛋白质的含量；

b）加工工艺中包含乳和(或)乳制品中蛋白质的凝固过程，并赋予成品与（a）所描述产品类似的物理、化学和感官特性。

3.1.1 成熟干酪 ripened cheese

生产后不能马上使(食)用，应在一定温度下储存一定时间，以通过生化和物理变化产生该类干酪特性的干酪。

3.1.2 霉菌成熟干酪 mould ripened cheese

主要通过干酪内部和(或)表面的特征霉菌生长而促进其成熟的干酪。

3.1.3 未成熟干酪 unripened cheese

未成熟干酪(包括新鲜干酪)是指生产后不久即可使(食)用的干酪。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 生乳：应符合 GB 19301 的要求。

4.1.2 其它原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	具有该类产品正常的色泽。	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有该类产品特有的滋味和气味。	
组织状态	组织细腻，质地均匀，具有该类产品应有的硬度。	

4.3　污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.4　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.5　微生物限量：应符合表 2 的规定。

表 2　微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以 CFU/g 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
大肠菌群	5	2	100	1000	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	2	100	1000	GB 4789.10 平板计数法
沙门氏菌	5	0	0 /25g	—	GB 4789.4
单核细胞增生李斯特氏菌	5	0	0 /25g	—	GB 4789.30
酵母[b]　　≤	50				GB 4789.15
霉菌[b]　　≤	50				

[a] 样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。

[b] 不适用于霉菌成熟干酪。

4.6　食品添加剂和营养强化剂

4.6.1 食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.6.2 食品添加剂和营养强化剂的使用应符合GB 2760 和GB 14880的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 10765—2010

食品安全国家标准

婴儿配方食品

National food safety standard

Infant formula

2010-03-26 发布　　2011-04-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准Codex Stan 72-1981（Revision 2007）Stanard for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants中A部分，本标准与Codex Stan 72-1981的一致性程度为非等效。本标准还参照了中国营养学会2000年编著的《中国居民膳食营养素参考摄入量》。

本标准代替GB 10765-1997《婴儿配方乳粉I》、GB 10766-1997《婴儿配方乳粉II、III》、GB 10767-1997《婴幼儿配方粉及婴幼儿补充谷粉通用技术条件》、及其修改单。

本标准与GB 10765-1997、GB 10766-1997 和GB 10767-1997相比，主要变化如下：

——将三项标准整合为一项标准，标准名称改为《婴儿配方食品》；

——修改了标准中的各项条款。

本标准的附录A、附录B为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 10765-1997；

——GB 10766-1997；

——GB 10767-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴儿配方食品

1 范围

本标准适用于婴儿配方食品。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 婴儿 infant

指0～12月龄的人。

3.2 婴儿配方食品 infant formula

3.2.1 乳基婴儿配方食品：指以乳类及乳蛋白制品为主要原料，加入适量的维生素、矿物质和/或其他成分，仅用物理方法生产加工制成的液态或粉状产品。适于正常婴儿食用，其能量和营养成分能够满足0～6月龄婴儿的正常营养需要。

3.2.2 豆基婴儿配方食品：指以大豆及大豆蛋白制品为主要原料，加入适量的维生素、矿物质和/或其他成分，仅用物理方法生产加工制成的液态或粉状产品。适于正常婴儿食用，其能量和营养成分能够满足0～6月龄婴儿的正常营养需要。

4 技术要求

4.1 原料要求

产品中所使用的原料应符合相应的安全标准和/或相关规定，应保证婴儿的安全、满足营养需要，不应使用危害婴儿营养与健康的物质。

所使用的原料和食品添加剂不应含有谷蛋白。

不应使用氢化油脂。

不应使用经辐照处理过的原料。

4.2 感官要求：应符合表1 的规定。

表1 感官要求

项　　目	要　　求
色泽	符合相应产品的特性。
滋味、气味	符合相应产品的特性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表1（续）

项　　目	要　　求
组织状态	符合相应产品的特性，产品不应有正常视力可见的外来异物。
冲调性	符合相应产品的特性。

4.3　必需成分

4.3.1　产品中所有必需成分对婴儿的生长和发育是必需的。

4.3.2　产品在即食状态下每100mL所含的能量应在250 kJ（60 kcal）～295 kJ（70 kcal）范围。能量的计算按每100mL产品中蛋白质、脂肪、碳水化合物的含量，分别乘以能量系数17 kJ/g、37 kJ/g、17 kJ/g（膳食纤维的能量系数，按照碳水化合物能量系数的50%计算），所得之和为千焦/100毫升（kJ/100mL）值，再除以4.184为千卡/100毫升（kcal/100mL）值。

4.3.3　婴儿配方食品每100kJ（100 kcal）所含蛋白质、脂肪、碳水化合物的量应符合表2的规定。

4.3.4　对于乳基婴儿配方食品，首选碳水化合物应为乳糖、乳糖和葡萄糖聚合物。只有经过预糊化后的淀粉才可以加入到婴儿配方食品中，不得使用果糖。

表 2 蛋白质、脂肪和碳水化合物指标

营养素	指　　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
蛋白质[a]					
乳基婴儿配方食品/（g）	0.45	0.70	1.88	2.93	GB 5009.5
豆基婴儿配方食品/（g）	0.50	0.70	2.09	2.93	
脂肪[b]/（g）	1.05	1.40	4.39	5.86	GB 5413.3
其中：亚油酸/（g）	0.07	0.33	0.29	1.38	GB 5413.27
α-亚麻酸/（mg）	12	N.S.[c]	50	N.S.[c]	
亚油酸与α-亚麻酸比值	5:1	15:1	5:1	15:1	—
碳水化合物[d, e]/（g）	2.2	3.3	9.2	13.8	—

[a] 乳基婴儿配方食品中乳清蛋白含量应≥60%；婴儿配方食品中蛋白质含量的计算，应以氮（N）×6.25。

[b] 终产品脂肪中月桂酸和肉豆蔻酸（十四烷酸）总量＜总脂肪酸的20%；反式脂肪酸最高含量＜总脂肪酸的3%；芥酸含量＜总脂肪酸的1%；总脂肪酸指C4～C24脂肪酸的总和。

[c] N.S.为没有特别说明。

[d] 乳糖占碳水化合物总量应≥90%；对于乳基产品，计算乳糖占碳水化合物总量时，不包括添加的低聚糖和多聚糖类物质；乳糖百分比含量的要求不适用于豆基配方食品。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 2（续）

[e] 碳水化合物的含量A_1，按式（1）计算：

$$A_1 = 100 - (A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) \quad \text{……（1）}$$

式中：

A_1——碳水化合物的含量，g/100g；

A_2——蛋白质的含量，g/100g；

A_3——脂肪的含量，g/100g；

A_4——水分的含量，g/100g；

A_5——灰分的含量，g/100g；

A_6——膳食纤维的含量，g/100g。

4.3.5 维生素：应符合表 3 的规定。

表 3 维生素指标

营养素	指　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
维生素 A/（μg RE）[a]	14	43	59	180	GB 5413.9
维生素 D（μg）[b]	0.25	0.60	1.05	2.51	
维生素 E /（mg α-TE）[c]	0.12	1.20	0.50	5.02	
维生素 K_1/（μg）	1.0	6.5	4.2	27.2	GB 5413.10
维生素 B_1/（μg）	14	72	59	301	GB 5413.11
维生素 B_2/（μg）	19	119	80	498	GB 5413.12
维生素 B_6/（μg）	8.5	45.0	35.6	188.3	GB 5413.13
维生素 B_{12}/（μg）	0.025	0.360	0.105	1.506	GB 5413.14
烟酸（烟酰胺）/（μg）[d]	70	360	293	1506	GB 5413.15
叶酸/（μg）	2.5	12.0	10.5	50.2	GB 5413.16
泛酸/（μg）	96	478	402	2000	GB 5413.17
维生素 C/（mg）	2.5	17.0	10.5	71.1	GB 5413.18
生物素/（μg）	0.4	2.4	1.5	10.0	GB 5413.19

[a] RE为视黄醇当量。1 μg RE =1μg全反式视黄醇（维生素A）=3.33 IU 维生素A。维生素A只包括预先形成的视黄醇，在计算和声称维生素A活性时不包括任何的类胡萝卜素组分。

[b] 钙化醇，1μg维生素D=40 IU维生素D。

[c] 1 mg α-TE (α-生育酚当量)=1 mg d-α－生育酚。每克多不饱和脂肪酸中至少应含有0.5mg α-TE，维生素E含量的最小值应根据配方食品中多不饱和脂肪酸的双键数量进行调整：0.5mg α-TE/g亚油酸(18:2 n-6)；0.75mg α-TE/g α-亚麻酸 (18:3 n-3)；1.0mg α-TE/g花生四烯酸(20:4 n-6)；1.25mg α-TE/g二十碳五烯酸(20:5 n-3)；1.5mg α-TE/g二十二碳六烯酸（22:6 n-3）。

[d] 烟酸不包括前体形式。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.3.6 矿物质：应符合表 4 的规定。

表 4 矿物质指标

营养素	指标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
钠/（mg）	5	14	21	59	GB 5413.21
钾/（mg）	14	43	59	180	
铜/（μg）	8.5	29.0	35.6	121.3	
镁/（mg）	1.2	3.6[a]	5.0	15.1[a]	
铁/（mg）	0.10	0.36	0.42	1.51	
锌/（mg）	0.12	0.36	0.50	1.51	
锰/（μg）	1.2	24.0	5.0	100.4	
钙/（mg）	12	35	50	146	
磷/（mg）	6	24[a]	25	100[a]	GB 5413.22
钙磷比值	1:1	2:1	1:1	2:1	—
碘/（μg）	2.5	14.0	10.5	58.6	GB 5413.23
氯/（mg）	12	38	50	159	GB 5413.24
硒/（μg）	0.48	1.90	2.01	7.95	GB 5009.93
[a] 仅适用于乳基婴儿配方食品。					

4.4 可选择性成分

4.4.1 除了 4.3 中必需成分外，如果在产品中选择添加或标签中标示含有表 5 中一种或多种成分，其含量应符合表 5 的规定。

4.4.2 为改善婴儿配方食品的蛋白质质量或提高其营养价值，可参考附录 A 中推荐的婴儿配方食品中氨基酸含量值添加单体 L 型氨基酸。所使用的单体 L 型氨基酸来源应符合 GB14880 或附录 B 的规定。

4.4.3 如果在产品中添加除表5和附录B之外的其他物质，应符合国家相关规定。

表5 可选择性成分指标

可选择性成分	指标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
胆碱/（mg）	1.7	12.0	7.1	50.2	GB/T 5413.20
肌醇/（mg）	1.0	9.5	4.2	39.7	GB 5413.25
牛磺酸/（mg）	N.S.[a]	3	N.S.[a]	13	GB 5413.26
左旋肉碱/（mg）	0.3	N.S.[a]	1.3	N.S.[a]	—

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 5（续）

可选择性成分	指　　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
二十二碳六烯酸/（%总脂肪酸[b,c]）	N.S.[a]	0.5	N.S.[a]	0.5	GB 5413.27
二十碳四烯酸/（%总脂肪酸[b,c]）	N.S.[a]	1	N.S.[a]	1	GB 5413.27
[a] N.S.为没有特别说明。 [b] 如果婴儿配方食品中添加了二十二碳六烯酸(22:6 n-3)，至少要添加相同量的二十碳四烯酸(20:4 n-6)。长链不饱和脂肪酸中二十碳五烯酸(20:5 n-3)的量不应超过二十二碳六烯酸的量。 [c] 总脂肪酸指 C4～C24 脂肪酸的总和。					

4.5 其他指标：应符合表 6 的规定。

表 6　其他指标

项　　目		指　　标	检验方法
水分/（%）[a]	≤	5.0	GB 5009.3
灰分			GB 5009.4
乳基粉状产品/（%）	≤	4.0	
乳基液态产品（按总干物质计）/（%）	≤	4.2	
豆基粉状产品/（%）	≤	5.0	
豆基液态产品（按总干物质计）/（%）	≤	5.3	
杂质度（限乳基婴儿配方食品）			GB 5413.30
粉状产品/（mg/kg）	≤	12	
液态产品/（mg/kg）	≤	2	
[a]仅限于粉状婴儿配方食品。			

4.6　污染物限量：应符合表 7 的规定。

表 7　污染物限量（以粉状产品计）

项　　目		指　　标	检验方法
铅/（mg/kg）	≤	0.15	GB 5009.12
硝酸盐(以$NaNO_3$计）/（mg/kg）	≤	100	GB 5009.33
亚硝酸盐(以$NaNO_2$计)[a]/（mg/kg）	≤	2	
[a] 仅适用于乳基婴儿配方食品。			

4.7　真菌毒素限量：应符合表 8 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 8　真菌毒素限量（以粉状产品计）

项　　目	指　　标	检验方法
黄曲霉毒素M_1或黄曲霉毒素B_1[a]/（μg/kg）　　≤	0.5	GB 5009.24
[a] 黄曲霉毒素M_1限量适用于乳基婴儿配方食品；黄曲霉毒素B_1限量适用于豆基婴儿配方食品。		

4.8　微生物限量：粉状婴儿配方食品的微生物指标应符合表 9 的规定，液态婴儿配方食品的微生物指标应符合商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验。

表 9 微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量（若非指定，均以CFU/g或CFU/mL表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数[b]	5	2	1000	10000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	10	100	GB 4789.3平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	2	10	100	GB 4789.10平板计数法
阪崎肠杆菌[c]	3	0	0/100g	—	GB 4789.40计数法
沙门氏菌	5	0	0/25g	—	GB 4789.4
[a] 样品的分析及处理按GB 4789.1和GB 4789.18执行。 [b] 不适用于添加活性菌种（好氧和兼性厌氧益生菌）的产品 [产品中活性益生菌的活菌数应≥10^6CFU/ g (mL)]。 [c] 仅适用于供0～6月龄婴儿食用的配方食品。					

4.9 食品添加剂和营养强化剂

4.9.1　食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.9.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合GB 2760和GB 14880的规定。

4.10　脲酶活性：含有大豆成分的产品中脲酶活性应符合表 10 的规定。

表 10　脲酶活性指标

项　　目	指　　标	检验方法
脲酶活性定性测定	阴　　性	GB/T 5413.31[a]
[a] 液态婴儿配方食品的取样量应根据干物质含量进行折算。		

5　其他

5.1 标签

5.1.1 产品标签应符合GB 13432的规定，营养素和可选择成分含量标识应增加“100千焦(100kJ)”含量的标示。

5.1.2 标签中应注明产品的类别、婴儿配方食品属性（如乳基或豆基产品以及产品状态）和适用年龄。可供6月龄以上婴儿食用的配方食品，应标明“6个月龄以上婴儿食用本产品时，应配合添加辅助食品”。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1.3 婴儿配方食品应标明：“对于0～6月的婴儿最理想的食品是母乳，在母乳不足或无母乳时可食用本产品”。

5.1.4 标签上不能有婴儿和妇女的形象，不能使用“人乳化”、“母乳化”或近似术语表述。

5.2 使用说明

5.2.1 有关产品使用、配制指导说明及图解、贮存条件应在标签上明确说明。当包装最大表面积小于100cm^{2}或产品质量小于100g时，可以不标示图解。

5.2.2 指导说明应该对不当配制和使用不当可能引起的健康危害给予警示说明。

5.3 包装

可以使用食品级或纯度≥99.9%的二氧化碳和（或）氮气作为包装介质。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（资料性附录）
推荐的婴儿配方食品中必需与半必需氨基酸含量值

A.1 参照已发表的有代表性的中国人乳中必需与半必需氨基酸含量数据及有关氮含量和/或蛋白质含量的数据，并考虑一定的变异范围，计算出推荐的婴儿配方食品中必需与半必需氨基酸含量低限值（mg/g N）。

A.2 根据我国人乳中每种氨基酸的低限值（mg/g N），计算蛋白质含量最低时（1.88g/100 kcal）婴儿配方食品每 100 kcal 相对应的氨基酸含量，计算方法为人乳中每克氮的氨基酸毫克数除以氮转换系数 6.25 再乘以 1.88，结果参见表 A.1。建议婴儿配方食品中所含的必需和半必需氨基酸含量值不低于表 A.1 中的推荐值。

A.3 在计算时，可以将酪氨酸和苯丙氨酸的浓度相加；如果蛋氨酸和半胱氨酸的比例不足 2:1 时，也可以将两者相加。

表 A.1 推荐的婴儿配方食品中必需与半必需氨基酸含量值

氨基酸	指 标	
	mg/g N	mg/100 kcal
胱氨酸	80	24.1
组氨酸	120	36.1
异亮氨酸	300	90.2
亮氨酸	540	162.4
赖氨酸	350	105.3
蛋氨酸	65	19.6
苯丙氨酸	180	54.1
苏氨酸	250	75.2
色氨酸	110	33.1
酪氨酸	200	60.2
缬氨酸	310	93.2

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 B
（资料性附录）
可用于婴儿配方食品中的单体氨基酸

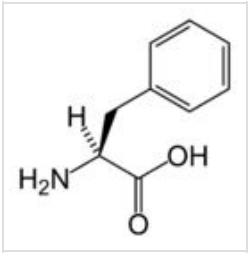
B.1 L-苯丙氨酸

B.1.1 名称及来源

名称：L-苯丙氨酸　　L-2-氨基-3-苯丙酸
来源：非动物源性原料
食品级

B.1.2 化学结构、分子式、分子量

化学结构：



分子式：$C_9H_{11}NO_2$
分子量：165.19

B.1.3 理化性质：自由流动的白色结晶或结晶性粉末。

B.1.4 理化指标：应符合表 B.1 的规定。

表 B.1 L-苯丙氨酸理化指标

项　　目		指　　标
比旋光度 a_m（20℃，D）		−33.2～−35.2
含量（以干物质计）/（%）	≥	98.5
水分/（%）	≤	0.2
pH 值		5.4～6.0
灰分/（%）	≤	0.1
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤	0.3
砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤	0.2

B.2 L-胱氨酸

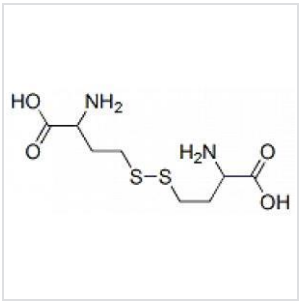
B.2.1 名称及来源

名称：L-胱氨酸　L-3,3'-二硫双（2-氨基丙酸）
来源：非动物源性原料
食品级

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.2.2 化学结构、分子式、分子量

化学结构：



分子式：$C_6H_{12}N_2O_4S_2$

分子量：240.3

B.2.3 理化性质：无色到白色结晶或结晶性粉末，无臭。

B.2.4 理化指标：应符合表 B.2 的规定。

表 B.2 L-胱氨酸理化指标

项　　目		指　　标
比旋光度 a_m（20℃，D）		−215～−225
含量（以干物质计）/（%）	≥	98.5
水分/（%）	≤	0.2
pH 值		5.0～6.5
灰分/（%）	≤	0.1
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤	0.3
砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤	0.2

B.3 L-亮氨酸

B.3.1 名称及来源

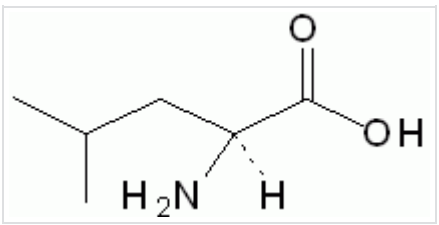
名称：L-亮氨酸　　L-2-氨基-4-甲基戊酸

来源：非动物源性原料

食品级

B.3.2 化学结构、分子式、分子量

化学结构：



分子式：$C_6H_{13}NO_2$

分子量：131.17

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.3.3 理化性质：白色结晶或结晶性粉末；无臭，味微苦。

B.3.4 理化指标：应符合表 B.3 的规定。

表 B.3 L-亮氨酸理化指标

项　　目		指　　标
比旋光度 a_m（20℃，D）		14.5～16.5
含量（以干物质计）/（%）	≥	98.5
水分/（%）	≤	0.2
pH 值		5.5～6.5
灰分/（%）	≤	0.1
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤	0.3
砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤	0.2

B.4 L-酪氨酸

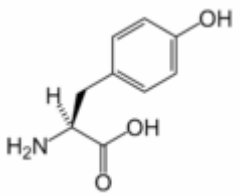
B.4.1 名称及来源

名称：L-酪氨酸　　S-氨基-3（4-羟基苯基）-丙酸

来源：从甜菜酒中分离

B.4.2 化学结构、分子式、分子量

化学结构：



分子式：$C_9H_{11}NO_3$

分子量：181.19

B.4.3 理化性质：本品为白色丝光状结晶或结晶性粉末。

B.4.4 理化指标：应符合表 B.4 的规定。

表 B.4 L-酪氨酸理化指标

项　　目		指　　标
比旋光度 a_m（20℃，D）		－11.0～－12.3
含量（以干物质计）/（%）	≥	99.0
水分/（%）	≤	0.3
pH 值[a]		—
灰分/（%）	≤	0.1
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤	0.3
砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤	0.2
[a]酪氨酸不要求 pH 值。		

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.5 L-色氨酸

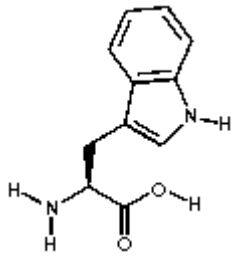
B.5.1 名称及来源

名称：L-色氨酸　L-2-氨基-3-吲哚基-1-丙酸

来源：大肠杆菌发酵丝氨酸和吲哚分解而得

B.5.2 化学结构、分子式、分子量

化学结构：



分子式：$C_{11}H_{12}N_2O_2$

分子量：204.23

B.5.3 理化性质：白色至黄白色结晶体或结晶性粉末。

B.5.4 理化指标：应符合表 B.5 的规定。

表 B.5 L-色氨酸理化指标

项　目		指　标
比旋光度 a_m（20℃，D）		−30.0～−33.0
含量（以干物质计）/（%）	≥	98.5
水分/（%）	≤	0.3
pH 值		5.5～7.0
灰分/（%）	≤	0.1
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤	0.3
砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤	0.2

B.6 L-组氨酸

B.6.1 名称及来源

名称：L-组氨酸　α-氨基 β-咪唑基丙酸

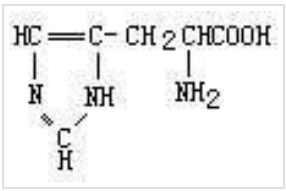
来源：非动物源性原料

食品级

B.6.2 化学结构、分子式、分子量

化学结构：

食品伙伴网http://www.foodmate.net



分子式：$C_6H_9N_3O_2$

分子量：155.15

B.6.3 理化性质：自由流动的白色结晶或结晶性粉末。

B.6.4 理化指标：应符合表 B.6 的规定。

表 B.6 L-组氨酸理化指标

项　　目		指　　标
比旋光度 a_m（20℃，D）		11.5～13.5
含量（以干物质计）/（%）	≥	98.5
水分/（%）	≤	0.2
pH 值		7.0～8.5
灰分/（%）	≤	0.2
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤	0.3
砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤	0.2

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 10767—2010

食品安全国家标准
较大婴儿和幼儿配方食品

National food safety standard

Older infants and young children formula

2010-03-26 发布　　2011-04-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的 Codex Stan 156-1987（Amendment 1989）Codex Standard for Follow-up Infant Formulas 标准，本标准与 Codex Stan 156-1987 的一致性程度为非等效。本标准参照了中国营养学会 2000 年编著的《中国居民膳食营养素参考摄入量》。

本标准代替GB 10767-1997《婴幼儿配方粉及婴幼儿补充谷粉通用技术条件》、GB 10769-1997《婴幼儿断奶期辅助食品》、GB 10770-1997《婴幼儿断奶期补充食品》、及其修改单。

本标准与GB 10767-1997、GB 10769-1997、GB 10770-1997相比，主要变化如下：

——将上述三项标准整合为一项标准，标准名称改为《较大婴儿和幼儿配方食品》；

——修改了标准中的各项条款。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 10767-1997；

——GB 10769-1989、GB 10769-1997；

——GB 10770-1989、GB 10770-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

较大婴儿和幼儿配方食品

1 范围

本标准适用于较大婴儿和幼儿配方食品。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 较大婴儿 older infants

指6～12月龄的人。

3.2 幼儿 young children

指12～36月龄的人。

3.3 较大婴儿和幼儿配方食品 older infants and young children formula

以乳类及乳蛋白制品和/或大豆及大豆蛋白制品为主要原料，加入适量的维生素、矿物质和/或其他辅料，仅用物理方法生产加工制成的液态或粉状产品，适用于较大婴儿和幼儿食用，其营养成分能满足正常较大婴儿和幼儿的部分营养需要。

4 技术要求

4.1 原料要求

产品中所使用的原料应符合相应的安全标准和/或相关规定，应保证较大婴儿和幼儿的安全、满足营养需要，不应使用危害较大婴儿和幼儿营养与健康的物质。

不应使用氢化油脂。

不应使用经辐照处理过的原辅材料。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求
色泽	符合相应产品的特性。
滋味、气味	符合相应产品的特性。
组织状态	符合相应产品的特性，产品不应有正常视力可见的外来异物。
冲调性	符合相应产品的特性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.3 必需成分

4.3.1 产品中所有必需成分对较大婴儿和幼儿的生长和发育是必需的。

4.3.2 即食状态下较大婴儿和幼儿配方食品每100mL所含的能量应在250 kJ（60 kcal）～355 kJ（85 kcal）范围。能量的计算按每100mL产品中蛋白质、脂肪、碳水化合物的含量，分别乘以能量系数17 kJ/g、37 kJ/g、17 kJ/g（膳食纤维的能量系数，按照碳水化合物能量系数的50%计算），所得之和为千焦/100毫升（kJ/100mL）值，再除以4.184为千卡/100毫升（kcal/100mL）值。

4.3.3 产品在即食状态下每100kJ（100 kcal）所含蛋白质、脂肪应符合表2的规定。反式脂肪酸含量不得超过总脂肪酸的3%。

表 2 蛋白质、脂肪指标

营养素	指　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
蛋白质[a]/（g）	0.7	1.2	2.9	5.0	GB 5009.5
脂肪/（g）	0.7	1.4	2.9	5.9	GB 5413.3
其中：亚油酸/（g）	0.07	N.S.[b]	0.29	N.S.[b]	GB 5413.27
[a] 蛋白质含量的计算，应以氮（N）×6.25。 [b] N.S.为没有特别说明。					

4.3.4 维生素：应符合表 3 的规定。

表 3 维生素指标

营养素	指　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
维生素 A/（μg RE）[a]	18	54	75	225	GB 5413.9
维生素 D[b]/（μg）	0.25	0.75	1.05	3.14	
维生素 E /（mg α-TE[c]）	0.15	N.S.[e]	0.63	N.S.[e]	
维生素 K_1/（μg）	1	N.S.[e]	4	N.S.[e]	GB 5413.10
维生素 B_1/（μg）	11	N.S.[e]	46	N.S.[e]	GB 5413.11
维生素 B_2/（μg）	11	N.S.[e]	46	N.S.[e]	GB 5413.12
维生素 B_6/（μg）	11	N.S.[e]	46	N.S.[e]	GB 5413.13
维生素 B_{12}/（μg）	0.04	N.S.[e]	0.17	N.S.[e]	GB 5413.14
烟酸（烟酰胺）[d]/（μg）	110	N.S.[e]	460	N.S.[e]	GB 5413.15
叶酸/（μg）	1	N.S.[e]	4	N.S.[e]	GB 5413.16

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 3（续）

营养素	指　　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
泛酸/（μg）	70	N.S.[e]	293	N.S.[e]	GB 5413.17
维生素 C/（mg）	1.8	N.S.[e]	7.5	N.S.[e]	GB 5413.18
生物素/（μg）	0.4	N.S.[e]	1.7	N.S.[e]	GB 5413.19

[a] RE为视黄醇当量。1 μg RE =1μg全反式视黄醇（维生素A）=3.33 IU 维生素A。维生素A只包括预先形成的视黄醇，在计算和声称维生素A活性时不包括任何类胡萝卜素组分。

[b] 钙化醇，1μg维生素D=40 IU维生素D。

[c] 1 mg α-TE (α-生育酚当量)=1 mg d-α-生育酚。每克多不饱和脂肪酸中至少应含有 0.5mg α-TE，维生素 E 含量的最小值应根据配方食品中多不饱和脂肪酸的双键数量进行调整：0.5mg α-TE/g 亚油酸(18:2n-6)；0.75mg α-TE/g α-亚麻酸 (18:3n-3)；1.0mg α-TE/g 花生四烯酸(20:4n-6)；1.25mg α-TE/g 二十碳五烯酸(20:5n-3)；1.5mg α-TE/g 二十二碳六烯酸（22:6n-3）。

[d] 烟酸不包括前体形式。

[e] N.S.为没有特别说明。

4.3.5　矿物质：应符合表 4 的规定。

表 4 矿物质指标

营养素	指　　标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
钠/（mg）	N.S.[a]	20	N.S.[a]	84	GB 5413.21
钾/（mg）	18	69	75	289	
铜/（μg）	7	35	29	146	
镁/（mg）	1.4	N.S.[a]	5.9	N.S.[a]	
铁/（mg）	0.25	0.50	1.05	2.09	
锌/（mg）	0.1	0.3	0.4	1.3	
钙/（mg）	17	N.S.[a]	71	N.S.[a]	
磷/（mg）	8.3	N.S.[a]	34.7	N.S.[a]	GB 5413.22
钙磷比值	1.2:1	2:1	1.2:1	2:1	—
碘/（μg）	1.4	N.S.[a]	5.9	N.S.[a]	GB 5413.23
氯/（mg）	N.S.[a]	52	N.S.[a]	218	GB 5413.24

[a] N.S.为没有特别说明。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.4 可选择性成分

4.4.1 除了 4.3 必需成分外，如果在产品中选择性添加或标签中标示含有表 5 中的一种或多种成分，其含量应符合表 5 的规定。

4.4.2 如果在产品中添加除4.3和4.4.1之外的其它物质，应符合国家相关规定。

表 5 可选择性成分

可选择性成分	指标				检验方法
	每 100 kJ		每 100 kcal		
	最小值	最大值	最小值	最大值	
硒/（μg）	0.48	1.90	2.01	7.95	GB 5009.93
胆碱/（mg）	1.7	12.0	7.1	50.2	GB/T 5413.20
锰/（μg）	0.25	24.0	1.05	100.4	GB 5413.21
肌醇/（mg）	1.0	9.5	4.2	39.7	GB 5413.25
牛磺酸/（mg）	N.S.[a]	3	N.S.[a]	13	GB 5413.26
左旋肉碱/（mg）	0.3	N.S.[a]	1.3	N.S.[a]	—
二十二碳六烯酸/(%总脂肪酸[b])	N.S.[a]	0.5	N.S.[a]	0.5	GB 5413.27
二十碳四烯酸/（%总脂肪酸[b]）	N.S.[a]	1	N.S.[a]	1	

[a] N.S.为没有特别说明。

[b] 总脂肪酸指 C4～C24 脂肪酸的总和。

4.5 其他指标：应符合表6的规定。

表 6 其他指标

项目		指标	检验方法
水分/（%）[a]	≤	5.0	GB 5009.3
灰分			GB 5009.4
粉状产品/（%）	≤	5.0	
液态产品（按总干物质计）/（%）	≤	5.3	
杂质度[b]			GB 5413.30
粉状产品/（mg/kg）	≤	12	
液态产品/（mg/kg）	≤	2	

[a] 仅限于粉状产品。

[b] 不适用于添加蔬菜和水果的产品。

4.6 污染物限量：应符合表7的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 7 污染物限量（以粉状产品计）

项　　目	指　　标	检验方法
铅/（mg/kg）　　≤	0.15	GB 5009.12
硝酸盐(以$NaNO_3$计)[a]/（mg/kg）　　≤	100	GB 5009.33
亚硝酸盐(以$NaNO_2$计)[b]/（mg/kg）　　≤	2	
[a] 不适用于添加蔬菜和水果的产品。 [b] 仅适用于乳基产品。		

4.7　真菌毒素限量：应符合表 8 的规定。

表 8 真菌毒素限量（以粉状产品计）

项　　目	指　　标	检验方法
黄曲霉毒素M_1或黄曲霉毒素B_1[a]/（μg/kg）　　≤	0.5	GB 5009.24
[a] 黄曲霉毒素M_1限量适用于以乳类及乳蛋白制品为主要原料的产品；黄曲霉毒素B_1限量适用于以豆类及大豆蛋白制品为主要原料的产品。		

4.8　微生物限量:粉状产品中微生物指标应符合表 9 的规定;液态产品中微生物指标应符合商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验。

表 9 微生物限量

项目	采样方案[a]及限量（若非指定，均以CFU/g或CFU/mL表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数[b]	5	2	1000	10000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	10	100	GB 4789.3平板计数法
沙门氏菌	5	0	0/25g	—	GB 4789.4
[a] 样品的分析及处理按GB 4789.1和GB 4789.18执行。 [b] 不适用于添加活性菌种（好氧和兼性厌氧益生菌）的产品［产品中活性益生菌的活菌数应≥10^6 CFU/ g (mL)］。					

4.9 食品添加剂和营养强化剂

4.9.1　食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.9.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合GB 2760和GB 14880的规定。

4.10　脲酶活性：含有大豆成分的产品中脲酶活性应符合表 10 的规定。

表 10　脲酶活性指标

项　　目	指　标	检验方法
脲酶活性定性测定	阴　性	GB/T 5413.31 [a]
[a] 液态产品的取样量应根据干物质含量进行折算。		

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5 其他

5.1 标签

5.1.1 产品标签应符合 GB 13432 的规定标示，营养素和可选择成分含量标识应增加“100 千焦(100kJ)”含量的标示。

5.1.2 标签中应注明产品的类别、较大婴儿配方食品或较大婴儿和幼儿配方食品的属性（如乳基和/或豆基产品以及产品状态）和适用年龄。较大婴儿配方食品应标明“须配合添加辅助食品”。

5.2 使用说明

5.2.1 有关产品使用、配制指导说明及图解、贮存条件应在标签上明确说明。当包装最大表面积小于100cm^{2}或产品质量小于 100g 时，可以不标示图解。

5.2.2 指导说明应对不当配制和使用不当可能引起的健康危害给予警示说明。

5.3 包装

可以使用食品级或纯度≥99.9%的二氧化碳和（或）氮气作为包装介质。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 10769—2010

食品安全国家标准
婴幼儿谷类辅助食品

National food safety standard

Cereal-based complementary foods for infants and young children

2010-03-26 发布　　2011-04-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准 Codex Stan 74-1981（Revision 2006），Codex Standard for Processed Cereal-based Foods for Infants and Young Children，本标准与 Codex Stan 74-1981 的一致性程度为非等效。本标准参照了中国营养学会 2000 年编著的《中国居民膳食营养素参考摄入量》。

本标准代替 GB 10767-1997《婴幼儿配方粉及婴幼儿补充谷粉通用技术条件》、GB 10769-1997《婴幼儿断奶期辅助食品》、GB 10770-1997《婴幼儿断奶期补充食品》、及其修改单。

本标准与 GB 10767-1997、GB 10769-1997 和 GB 10770-1997 相比，主要变化如下：

——将三项标准整合为一项标准，标准名称改为《婴幼儿谷类辅助食品》；

——修改了标准中的各项条款。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 10767-1997；

——GB 10769-1989、GB 10769-1997；

——GB 10770-1989、GB 10770-1997。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

婴幼儿谷类辅助食品

1 范围

本标准适用于6月龄以上婴儿和幼儿食用的婴幼儿谷类辅助食品。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 婴儿 infant

指0～12月龄的人。

3.2 幼儿 young children

指12～36月龄的人。

3.3 婴幼儿谷类辅助食品 cereal-based complementary foods for infants and young children

以一种或多种谷物（如：小麦、大米、大麦、燕麦、黑麦、玉米等）为主要原料，且谷物占干物质组成的25％以上，添加适量的营养强化剂和（或）其他辅料，经加工制成的适于6月龄以上婴儿和幼儿食用的辅助食品。

4 产品分类

4.1 婴幼儿谷物辅助食品

用牛奶或其他含蛋白质的适宜液体冲调后食用的婴幼儿谷类辅助食品。

4.2 婴幼儿高蛋白谷物辅助食品

添加了高蛋白质原料，用水或其他不含蛋白质的适宜液体冲调后食用的婴幼儿谷类辅助食品。

4.3 婴幼儿生制类谷物辅助食品

煮熟后方可食用的婴幼儿谷类辅助食品。

4.4 婴幼儿饼干或其他婴幼儿谷物辅助食品

可直接食用或粉碎后加水、牛奶或其他适宜液体冲调后食用的婴幼儿谷类辅助食品。

5 技术要求

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1 原料要求

所使用的原料应符合相应的安全标准和/或相关规定。应保证婴幼儿的安全，满足营养需要，不应使用危害婴幼儿营养与健康的物质。

不应使用氢化油脂。

不应使用经辐照处理过的原料。

5.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求
色泽	符合相应产品的特性。
滋味、气味	符合相应产品的特性。
组织状态	符合相应产品的特性，不应有正常视力可见的外来异物。
冲调性	符合相应产品的特性。

5.3 基本的营养成分指标：产品中基本的营养成分指标应符合表 2 的规定。

表 2 基本的营养成分指标

项　　目	指　　标				检验方法
	婴幼儿谷物辅助食品	婴幼儿高蛋白谷物辅助食品	婴幼儿生制类谷物辅助食品	婴幼儿饼干或其他婴幼儿谷物辅助食品[a]	
能量[b]/(kJ/100g(kcal/100g)) ≥	1250(299)	1506(360)	1250(299)	1250(299)	—
蛋白质/(g/100 kJ(g/100kcal))	≥0.33 (1.4)	0.66～1.30 (2.8～5.4)	≥0.33 (1.4)	0.33～1.30 (1.4～5.4)	GB 5009.5
脂肪/(g/100 kJ(g/100kcal)) ≤	0.8(3.3)	1.1(4.6)	0.8(3.3)	0.8(3.3)	GB 5413.3
其中[c]：亚油酸(g/100 kJ)	—	0.07～0.29	—	—	GB 5413.27
月桂酸/(%总脂肪) ≤		15.0			
肉豆蔻酸/(%总脂肪) ≤		15.0			
维生素 A/(μgRE/100 kJ(μgRE/100kcal))	14～43（59～180）			—	GB 5413.9
维生素 D/(μg/100 kJ(μg/100kcal))	0.25～0.75（1.05～3.14）			—	
维生素 B_1/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	12.5(52.3)				GB 5413.11
钙/(mg/100 kJ(mg/100 kcal)) ≥	12.0(50.2)	20.0(83.7)	12.0(50.2)	12.0(50.2)	GB 5413.21
铁/(mg/100 kJ(mg/100 kcal)	0.25～0.50 （1.05～2.09）			—	
锌/(mg/100 kJ(mg/100 kcal)	0.17～0.46 （0.71～1.92）			—	
钠/(mg/100 kJ(mg/100 kcal) ≤	24.0 （100.4）				

[a] 婴幼儿饼干或其他婴幼儿谷物辅助食品如果选择添加维生素A、维生素D、铁、锌成分，其含量应符合表2中其他类别产品相应成分的要求。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表2（续）

[b]能量的计算按每100g产品中蛋白质、脂肪、碳水化合物的含量，分别乘以能量系数17 kJ/g、37 kJ/g、17 kJ/g(膳食纤维的能量系数，按照碳水化合物能量系数的50%计算)，所得之和为千焦/100克(kJ/100g)值，再除以4.184为千卡/100克(kcal/100g)值。

其中，碳水化合物的含量A_1，按式(1)计算：

$$A_1 = 100 - (A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) \cdots\cdots(1)$$

式中：

A_1——碳水化合物的含量，g/100g；

A_2——蛋白质的含量，g/100g；

A_3——脂肪的含量，g/100g；

A_4——水分的含量，g/100g；

A_5——灰分的含量，g/100g；

A_6——膳食纤维的含量，g/100g。

[c] 仅适用于脂肪≥0.8 g/100 kJ的产品。

5.4 可选择的营养成分指标

除了5.3基本的营养成分指标外，如果在产品中选择添加或标签中标示含有表3中的一种或多种成分，其含量应符合表3的规定。

如果在产品中添加除5.3和表3之外的其他物质，应符合国家相关规定。

表 3 可选择的营养成分指标

项　　目	指　　标	检验方法
维生素 E/(mg/100 kJ(mg/100 kcal)	0.08～1.20 (0.33～5.02)	GB 5413.9
维生素 B_2/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	13.0 (54.4)	GB 5413.12
维生素 B_6/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	8.4 (35.1)	GB 5413.13
维生素 B_{12}/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	0.02 (0.08)	GB 5413.14
烟酸/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	83.7 (350.2)	GB 5413.15
叶酸/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	1.2 (5.0)	GB 5413.16
泛酸/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	50.4 (210.9)	GB 5413.17
维生素 C/(mg/100 kJ(mg/100 kcal) ≥	1.4 (5.9)	GB 5413.18
生物素/(μg/100 kJ(μg/100kcal)) ≥	0.17 (0.71)	GB 5413.19
磷/(mg/100 kJ(mg/100 kcal)	8.4～30.0 (35.1～125.5)	GB 5413.22
碘/(μg/100 kJ(μg/100kcal))	1.4～8.8 (5.9～36.8)	GB 5413.23
钾/(mg/100kJ(mg/100kcal))	13～66(56～278)	GB 5413.21

5.5 如果在产品中添加碳水化合物（包括蔗糖、果糖、葡萄糖、葡萄糖浆或蜂蜜），碳水化合物添加限量应符合表 4 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 4 碳水化合物添加限量

项　　目	指　　标			检验方法
	婴幼儿谷物辅助食品	婴幼儿高蛋白谷物辅助食品	婴幼儿饼干或其他婴幼儿谷物辅助食品	
碳水化合物添加总量/(g/100kJ(g/100kcal)) ≤	1.8（7.5)	1.2(5.0)	1.8 (7.5)	按配料计算
果糖添加量/(g/100 kJ(g/100kcal)) ≤	0.9 (3.8)	0.6 (2.5)	0.9 (3.8)	

5.6　其他指标：应符合表5的规定。

表 5 其他指标

项　　目	指　　标				检验方法
	婴幼儿谷物辅助食品	婴幼儿高蛋白谷物辅助食品	婴幼儿生制类谷物辅助食品	婴幼儿饼干或其他婴幼儿谷物辅助食品[a]	
水分/(%) ≤	6.0		13.5	6.0	GB 5009.3
不溶性膳食纤维/(%) ≤	5.0				GB 5413.6
[a] 水分指标不包括其他婴幼儿谷物辅助食品。					

5.7 污染物限量：应符合表 6 的规定。

表 6 污染物限量

项　　目		指　　标	检验方法
铅/(mg/kg)	添加鱼类、肝类、蔬菜类的产品 ≤	0.30	GB 5009.12
	其他产品 ≤	0.20	
无机砷/(mg/kg)	添加藻类的产品 ≤	0.30	GB/T 5009.11
	其他产品 ≤	0.20	
硝酸盐[a](以$NaNO_3$计)/(mg/kg) ≤		100	GB 5009.33
亚硝酸盐[b](以$NaNO_2$计)/(mg/kg) ≤		2	
[a]硝酸盐指标不适用于添加蔬菜和水果的产品。 [b]亚硝酸盐指标不适用于添加豆类的产品。			

5.8　真菌毒素限量：应符合表 7 的规定。

表 7 真菌毒素限量

项　　目	指　　标	检验方法
黄曲霉毒素B_1/(μg/kg) ≤	0.5	GB 5009.24

5.9　微生物限量：应符合表 8 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 8 微生物限量

项目	采样方案[a]及限量(若非指定，均以CFU/g或CFU/mL表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数[b]	5	2	1000	10000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	10	100	GB 4789.3平板计数法
沙门氏菌	5	0	0/25g	—	GB 4789.4

[a] 样品的分析及处理按 GB 4789.1执行。

[b] 不适用于婴幼儿生制类谷物辅助食品和添加活性菌种(好氧和兼性厌氧益生菌)的产品[产品中活性益生菌的活菌数应≥10^6CFU/g (mL)]。

5.10 食品添加剂和营养强化剂

5.10.1 食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

5.10.2 食品添加剂和营养强化剂的使用应符合GB 2760和GB 14880的规定。

5.11 脲酶活性：含有大豆成分的产品中脲酶活性应符合表 9 的规定。

表 9 脲酶活性指标

项　　目	指　　标	检验方法
脲酶活性定性测定	阴　　性	GB/T 5413.31

6 其他

6.1 产品标签应符合 GB 13432 的规定，营养成分表的标识应增加“100 千焦(100kJ)”含量的标示。

6.2 标签中应按 4.1～4.4 的规定标明产品的类别名称，如“婴幼儿高蛋白谷物辅助食品”等。

6.3 对 4.1 婴幼儿谷物辅助食品应在标签中标明 “需用牛奶或其他含蛋白质的适宜液体冲调”或类似文字。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 10770—2010

食品安全国家标准
婴幼儿罐装辅助食品

National food safety standard

Canned complementary foods for infants and young children

2010-03-26 发布　　2011-04-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准 Codex Stan 73-1981(Amendment 1985,1987,1989) Codex Standard for Canned Baby Food，本标准与 Codex Stan 73-1981 的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 10775-1989《婴幼儿辅助食品 苹果泥》、GB 10776-1989《婴幼儿辅助食品 胡萝卜泥》、GB 10777-1989《婴幼儿辅助食品 肉泥》、GB 10778-1989《婴幼儿辅助食品 骨泥》、GB 10779-1989《婴幼儿辅助食品 鸡肉菜糊》、GB 10780-1989《婴幼儿辅助食品 番茄汁》。

本标准与 GB 10775-1989、GB 10776-1989、GB 10777-1989、GB 10778-1989、GB 10779-1989 和 GB 10780-1989 六项标准相比，主要变化如下：

——将六项标准整合为一项标准，标准名称改为《婴幼儿罐装辅助食品》；

——修改了标准中的各项条款。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 10775-1989；

——GB 10776-1989；

——GB 10777-1989；

——GB 10778-1989；

——GB 10779-1989；

——GB 10780-1989。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准
婴幼儿罐装辅助食品

1 范围

本标准适用于6月龄以上婴儿和幼儿食用的婴幼儿罐装辅助食品。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 婴儿 infant

指0～12月龄的人。

3.2 幼儿 young children

指12～36月龄的人。

3.3 婴幼儿罐装辅助食品 canned complementary foods for infants and young children

食品原料经处理、灌装、密封、杀菌或无菌灌装后达到商业无菌，可在常温下保存的适于6月龄以上婴幼儿食用的食品。

4 产品分类

4.1 泥（糊）状罐装食品

吞咽前不需咀嚼的泥（糊）状婴幼儿罐装食品。

4.2 颗粒状罐装食品

含有5mm以下的碎块，颗粒大小应保障不会引起婴幼儿吞咽困难、稀稠适中的婴幼儿罐装食品。

4.3 汁类罐装食品

呈液体状态的婴幼儿罐装食品。

5 技术要求

5.1 原料要求

产品中所使用的原料应符合相应的安全标准和/或相关规定，应保证婴幼儿的安全，满足营养需要，不应使用危害婴幼儿营养与健康的物质。

与产品直接接触的生产用水应符合GB 5749的要求。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

畜肉和禽肉类、鱼类原料应去掉骨、鳞、刺等不适宜婴幼儿食用的物质；对植物来源的原料必要时去除粗纤维。

水果、蔬菜类原料应使用未腐败变质的优质原料或其制品；畜肉和禽肉类、鱼类原料应使用新鲜或冷冻的优质原料或其制品。

不应使用经辐照处理过的原料。

不应使用氢化油脂。

不应使用香辛料。

5.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	符合相应产品的特性。	GB/T 10786
滋味、气味	符合相应产品的特性。	
组织状态	符合相应产品的特性，不应有正常视力可见的外来异物，不应含有骨、鳞、刺等不适宜婴幼儿食用的物质。	

5.3 理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项　　目	指　　标			检验方法
	产品[a]	产品[b]	产品[c]	
配料比 /(%) ≥	40[d]	8[e]	—	按配料计算
蛋白质/(g /100kJ (g /100kcal))[f] ≥	1.7 (7)	0.7(3)	—	GB 5009.5
脂肪[g]/(g /100kJ (g /100kcal))[f] ≤	1.4 (6)	1.4 (6)	—	GB/T 5009.6
氯化钠	—	—	不应添加[h]	—
总钠[i]/(mg /100g) ≤	200			GB 5413.21

[a] 畜肉、禽肉、鱼肉或动物内脏是产品中除水以外的唯一配料或唯一蛋白质来源的产品，不包括汁类产品；

[b] 畜肉、禽肉、鱼肉、动物内脏等分别(或组合)与水果或蔬菜混合制作的产品，不包括汁类产品；

[c] a 和 b 之外的产品；

[d] 畜肉、禽肉、鱼肉或动物内脏等配料量占产品总质量的百分比；

[e] 在畜肉、禽肉、鱼肉或动物内脏等配料中，含量最多的配料占产品总质量的百分比；

[f] 能量值参照 GB 10769 中的方法计算；

[g] 仅适用于含畜肉、禽肉、鱼肉、动物内脏等肉类原料的产品；

[h] 仅适用于水果类产品；

[i] 以即食状态计。

5.4 污染物限量：应符合表 3 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 3　污染物限量

项　　目			指　　标	检验方法
铅/(mg/kg)	以水产及动物肝脏为原料的产品	≤	0.30	GB 5009.12
	其他原料的产品	≤	0.25	
无机砷/(mg/kg)	以水产及动物肝脏为原料的产品	≤	0.30	GB/T 5009.11
	其他原料的产品	≤	0.10	
汞/(mg/kg)		≤	0.02	GB/T 5009.17
锡[a]/(mg/kg)		≤	50	GB/T 5009.16
硝酸盐(以 $NaNO_3$ 计)[b]/(mg/kg)		≤	200	GB 5009.33
亚硝酸盐(以 $NaNO_2$ 计)[c]/(mg/kg)		≤	4	
[a] 仅适用于镀锡包装婴幼儿罐装辅助食品。 [b] 硝酸盐指标不适用于以蔬菜和水果为主要原料、仅添加其他少量辅料制成的婴幼儿罐装辅助食品。 [c] 亚硝酸盐指标不适用于豆类婴幼儿罐装辅助食品。				

5.5 微生物要求：应符合罐头食品商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验；番茄酱与番茄汁产品还应符合表 4 的规定。

表 4　微生物限量

项　　目		采样方案[a]及限量(CFU/g 或 CFU/mL)	检验方法
霉菌/(%视野)	≤	40	GB 4789.15
[a] 样品的分析及处理按 GB 4789.1 执行。			

5.6　食品添加剂和营养强化剂

5.6.1　食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

5.6.2　食品添加剂和营养强化剂的使用应符合GB 2760和GB 14880的规定。

6 其他

6.1　产品标签应符合GB 13432 的规定；营养成分表的标识应增加“100千焦(100kJ)”含量的标示。

6.2　标签中应标明适宜食用的婴幼儿月龄、食用方法及食用注意事项。

6.3　汁类罐装食品应标明产品中所含果蔬原汁或原浆的含量。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 11674—2010

食品安全国家标准

乳清粉和乳清蛋白粉

National food safety standard

Whey powder and whey protein powder

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准 Codex Stan 289-1995（Revision 2003, Amendment 2006）Standard for Whey Powders，本标准与 Codex Stan 289-1995（Revision 2003, Amendment 2006）的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 11674-2005《乳清粉卫生标准》。

本标准与 GB 11674-2005 相比，主要变化如下：

——标准名称改为《乳清粉和乳清蛋白粉》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——“理化指标”中的产品类别改为脱盐乳清粉、非脱盐乳清粉、乳清蛋白粉；

——增加了乳糖指标；

——删除了脂肪指标；

——删除了酸度（以乳酸计）指标；

——删除了铁（Fe）指标；

——“污染物限量”直接引用 GB 2762 的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用 GB 2761 的规定；

——删除“兽药残留”指标；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——增加了对营养强化剂的要求。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 11674-1989、GB 11674-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳清粉和乳清蛋白粉

1 范围

本标准适用于脱盐乳清粉、非脱盐乳清粉、浓缩乳清蛋白粉、分离乳清蛋白粉等产品。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 乳清 whey

以生乳为原料，采用凝乳酶、酸化或膜过滤等方式生产奶酪、酪蛋白及其它类似制品时，将凝乳块分离后而得到的液体。

3.2 乳清粉 whey powder

以乳清为原料，经干燥制成的粉末状产品。

3.2.1 脱盐乳清粉 demineralized whey powder

以乳清为原料，经脱盐、干燥制成的粉末状产品。

3.2.2 非脱盐乳清粉 non-demineralized whey powder

以乳清为原料，不经脱盐，经干燥制成的粉末状产品。

3.3 乳清蛋白粉 whey protein powder

以乳清为原料，经分离、浓缩、干燥等工艺制成的蛋白含量不低于25%的粉末状产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 乳清：由符合 GB 19301 要求的生乳为原料生产乳制品而得到的乳清。

4.1.2 其它原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 1　感官要求

项　　目	要　　求	检验方法
色泽	具有均匀一致的色泽。	取适量试样置于 50mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有产品特有的滋味、气味，无异味。	
组织状态	干燥均匀的粉末状产品、无结块、无正常视力可见杂质。	

4.3 理化指标：应符合表 2 的规定。

表2　理化指标

项　　目	指　　标			检验方法
	脱盐乳清粉	非脱盐乳清粉	乳清蛋白粉	
蛋白质/(g/100g)　　≥	10.0	7.0	25.0	GB 5009.5
灰分/(g/100g)　　≤	3.0	15.0	9.0	GB 5009.4
乳糖/(g/100g)　　≥	61.0		—	GB 5413.5
水分/(g/100g)　　≤	5.0		6.0	GB 5009.3

4.4　污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.5　真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6　微生物限量：应符合表 3 的规定。

表3 微生物限量

项　　目	采样方案[a]及限量（若非指定，均以 CFU/g 表示）				检验方法
	n	c	m	M	
金黄色葡萄球菌	5	2	10	100	GB 4789.10 平板计数法
沙门氏菌	5	0	0/25g	—	GB 4789.4
[a]样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。					

4.7　食品添加剂和营养强化剂

4.7.1 食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.7.2 食品添加剂和营养强化剂的使用应符合GB 2760和GB 14880的规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 12693—2010

食品安全国家标准

乳制品良好生产规范

National food safety standard

Good manufacturing practice for milk products

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准代替GB 12693–2003《乳制品企业良好生产规范》和GB/T 21692–2008《乳粉卫生操作规范》。

本标准对应于国际食品法典委员会（CAC）CAC/RCP 1–1969，Rev.4–2003 Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene及CAC/RCP 57–2004 Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products，本标准与CAC/RCP 1–1969，Rev.4–2003、CAC/RCP 57–2004的一致性程度为非等效；同时参考了欧盟法规（EC）No. 852/2004 On the hygiene of foodstuffs及（EC）No. 853/2004 Laying down specific hygiene rules for food of animal origin。

本标准与GB 12693–2003和GB/T 21692–2008相比，主要变化如下：

——标准名称改为《乳制品良好生产规范》；

——对适用范围进行了调整，强调了适用于各类乳制品企业；

——修改了标准条款框架；

——强调了在原料进厂、生产过程的食品安全控制、产品的运输和贮存整个生产过程中防止污染的要求；

——对生产设备进行了调整，从防止微生物、化学、物理污染的角度对生产设备提出了布局、材质和设计要求；

——取消了实验室建设中的硬件要求；

——增加了原料采购、验收、运输和贮存的相关要求；

——强调了生产过程的食品安全控制，并制定了控制微生物、化学、物理污染的主要措施；

——增加了包装材料及其使用要求；

——增加了关键控制点的控制指标、监测以及记录要求；

——增加了产品追溯与召回的具体要求；

——增加了记录和文件的管理要求。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 12693–1990、GB 12693–2003；

——GB/T 21692–2008。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

乳制品良好生产规范

1 范围

本标准适用于以牛乳（或羊乳）及其加工制品等为主要原料加工各类乳制品的生产企业。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 清洁作业区 cleaning work area

清洁度要求高的作业区域，如裸露待包装的半成品贮存、充填及内包装车间等。

3.2 准清洁作业区 quasi-cleaning work area

清洁度要求低于清洁作业区的作业区域，如原料预处理车间等。

3.3 一般作业区 commonly work area

清洁度要求低于准清洁作业区的作业区域，如收乳间、原料仓库、包装材料仓库、外包装车间及成品仓库等。

4 选址及厂区环境

按照 GB 14881 有关规定执行。

5 厂房和车间

5.1 设计和布局

5.1.1 凡新建、扩建、改建的工程项目均应按照国家相关规定进行设计和施工。

5.1.2 厂房和车间的布局应能防止乳制品加工过程中的交叉污染，避免接触有毒物、不洁物。

5.1.3 车间内清洁作业区、准清洁作业区与一般作业区之间应采取适当措施，防止交叉污染。

5.2 内部建筑结构

5.2.1 屋顶

5.2.1.1 加工、包装、贮存等场所的室内屋顶和顶角应易于清扫，防止灰尘积聚，避免结露、长霉或脱落等情形发生。清洁作业区、准清洁作业区及其他食品暴露场所（收乳间除外）屋顶若为易于藏污纳垢的结构，宜加设平滑易清扫的天花板；若为钢筋混凝土结构，其室内屋顶应平坦无缝隙。

5.2.1.2 车间内平顶式屋顶或天花板应使用无毒、无异味的白色或浅色防水材料建造，若喷涂涂料，应使用防霉、不易脱落且易于清洗的涂料。

5.2.1.3 蒸汽、水、电等配管不应设置于食品暴露的正上方，否则应安装防止灰尘及凝结水掉落的设施。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.2.2 墙壁

5.2.2.1 应使用无毒、无味、平滑、不透水、易清洗的浅色防腐材料构造。

5.2.2.2 清洁作业区与准清洁作业区的墙角及柱角应结构合理，易于清洗和消毒。

5.2.3 门窗

5.2.3.1 应使用光滑、防吸附的材料，并且易于清洗和消毒。

5.2.3.2 生产车间和贮存场所的门、窗应装配严密，应配备防尘、防动物及其他虫害的设施，并便于清洁。

5.2.3.3 清洁作业区、准清洁作业区的对外出入口应装设能自动关闭（如安装自动感应器或闭门器等）的门和（或）空气幕。

5.2.4 地面

5.2.4.1 地面应使用无毒、无味、不透水的材料建造，且须平坦防滑、无裂缝并易于清洗和消毒。

5.2.4.2 作业中有排水或废水流经的地面，以及作业环境经常潮湿或以水洗方式清洗作业等区域的地面宜耐酸耐碱，并应有一定的排水坡度及排水系统。

5.3 设施

5.3.1 供水设施

5.3.1.1 应能保证生产用水的水质、压力、水量等符合生产需要。

5.3.1.2 供水设备及用具应取得省级以上卫生行政部门的涉及饮用水卫生安全产品卫生许可批件。

5.3.1.3 供水设施出入口应增设安全卫生设施，防止动物及其他物质进入导致食品污染。

5.3.1.4 使用二次供水的，应符合 GB 17051 的规定。

5.3.1.5 使用自备水源的供水过程应符合国家卫生行政管理部门关于生活饮用水集中式供水单位的相关卫生要求。

5.3.1.6 不与食品接触的非饮用水（如冷却水、污水或废水等）的管道系统与生产用水的管道系统应明显区分，并以完全分离的管路输送，不应有逆流或相互交接现象。

5.3.1.7 生产用水的水质应符合 GB 5749 的规定。

5.3.2 排水系统

5.3.2.1 应配备适当的排水系统，且在设计和建造时应避免产品或生产用水受到污染。

5.3.2.2 排水系统应有坡度、保持通畅、便于清洗，排水沟的侧面和底面接合处应有一定弧度。

5.3.2.3 排水系统入口应安装带水封的地漏，以防止固体废弃物进入及浊气逸出。

5.3.2.4 排水系统内及其下方不应有生产用水的供水管路。

5.3.2.5 排水系统出口应有防止动物侵入的装置。

5.3.2.6 室内排水的流向应由清洁度要求高的区域流向清洁度要求低的区域，并有防止废水逆流的设计。

5.3.2.7 废水应排至废水处理系统或经其他适当方式处理。

5.3.3 清洁设施

应配备适当的专门用于食品、器具和设备清洁处理的设施，以及存放废弃物的设施等。

5.3.4 个人卫生设施

5.3.4.1 个人卫生设施应符合 GB 14881 的规定。

5.3.4.2 进入清洁作业区前应设置消毒设施，必要时设置二次更衣室。

5.3.5 通风设施

5.3.5.1 应具有自然通风或人工通风措施，减少空气来源的污染、控制异味，以保证食品的安全和产品特性。乳粉生产时清洁作业区还应控制环境温度，必要时控制空气湿度。

5.3.5.2 清洁作业区应安装空气调节设施，以防止蒸汽凝结并保持室内空气新鲜；一般作业区应安装通

食品伙伴网http://www.foodmate.net

风设施，及时排除潮湿和污浊的空气。厂房内进行空气调节、进排气或使用风扇时，其空气应由清洁度要求高的区域流向清洁度要求低的区域，防止食品、生产设备及内包装材料遭受污染。

5.3.5.3 在有臭味及气体（蒸汽及有毒有害气体）或粉尘产生而有可能污染食品的区域，应有适当的排除、收集或控制装置。

5.3.5.4 进气口应距地面或屋面 2m 以上，远离污染源和排气口，并设有空气过滤设备。排气口应装有易清洗、耐腐蚀的网罩，防止动物侵入；通风排气装置应易于拆卸清洗、维修或更换。

5.3.5.5 用于食品、清洁食品接触面或设备的压缩空气或其他气体应经过滤净化处理，以防止造成间接污染。

5.3.6 照明设施

5.3.6.1 厂房内应有充足的自然采光或人工照明，车间采光系数不应低于标准Ⅳ级。质量监控场所工作面的混合照度不宜低于 540 lx，加工场所工作面不宜低于 220 lx，其他场所不宜低于 110 lx，对光敏感测试区域除外。光源不应改变食品的颜色。

5.3.6.2 照明设施不应安装在食品暴露的正上方，否则应使用安全型照明设施，以防止破裂污染食品。

5.3.7 仓储设施

5.3.7.1 企业应具有与生产经营的乳制品品种、数量相适应的仓储设施。

5.3.7.2 应依据原料、半成品、成品、包装材料等性质的不同分设贮存场所，必要时应设有冷藏（冻）库。同一仓库贮存性质不同物品时，应适当隔离（如分类、分架、分区存放），并有明显的标识。

5.3.7.3 仓库以无毒、坚固的材料建成，地面平整，便于通风换气，并应有防止动物侵入的装置（如仓库门口应设防鼠板或防鼠沟）。

5.3.7.4 仓库应设置数量足够的栈板（物品存放架），并使物品与墙壁、地面保持适当距离，以利空气流通及物品的搬运。

5.3.7.5 冷藏（冻）库，应装设可正确指示库内温度的温度计、温度测定器或温度自动记录仪，且对温度进行适时监控，并记录。

6 设备

6.1 生产设备

6.1.1 一般要求

6.1.1.1 应具有与生产经营的乳制品品种、数量相适应的生产设备，且各个设备的能力应能相互匹配。

6.1.1.2 所有生产设备应按工艺流程有序排列，避免引起交叉污染。

6.1.1.3 应制定生产过程中使用的特种设备（如压力容器、压力管道等）的操作规程。

6.1.2 材质

6.1.2.1 与原料、半成品、成品直接或间接接触的所有设备与用具，应使用安全、无毒、无臭味或异味、防吸收、耐腐蚀且可承受反复清洗和消毒的材料制造。

6.1.2.2 产品接触面的材质应符合食品相关产品的有关标准，应使用表面光滑、易于清洗和消毒、不吸水、不易脱落的材料。

6.1.3 设计

6.1.3.1 所有生产设备的设计和构造应易于清洗和消毒，并容易检查。应有可避免润滑油、金属碎屑、污水或其他可能引起污染的物质混入食品的构造,并应符合相应的要求。

6.1.3.2 食品接触面应平滑、无凹陷或裂缝，以减少食品碎屑、污垢及有机物的聚积。

6.1.3.3 贮存、运输及加工系统（包括重力、气动、密闭及自动系统）的设计与制造应易于维持其良好的卫生状况。物料的贮存设备应能密封。

6.1.3.4 应有专门的区域贮存设备备件，以便设备维修时能及时获得必要的备件；应保持备件贮存区域

食品伙伴网http://www.foodmate.net

清洁干燥。

6.2 监控设备

6.2.1 用于测定、控制、记录的监控设备，如压力表、温度计等，应定期校准、维护，确保准确有效。

6.2.2 当采用计算机系统及其网络技术进行关键控制点监测数据的采集和对各项记录的管理时，计算机系统及其网络技术的有关功能可参考本标准附录A的规定。

6.3 设备的保养和维修

6.3.1 应建立设备保养和维修程序，并严格执行。

6.3.2 应建立设备的日常维护和保养计划，定期检修，并做好记录。

6.3.3 每次生产前应检查设备是否处于正常状态，防止影响产品卫生质量的情形发生；出现故障应及时排除并记录故障发生时间、原因及可能受影响的产品批次。

7 卫生管理

7.1 卫生管理制度

7.1.1 应制定卫生管理制度及考核标准，并实行岗位责任制。

7.1.2 应制定卫生检查计划，并对计划的执行情况进行记录并存档。

7.2 厂房及设施卫生管理

7.2.1 厂房内各项设施应保持清洁，及时维修或更新；厂房屋顶、天花板及墙壁有破损时，应立即修补，地面不应有破损或积水。

7.2.2 用于加工、包装、贮存和运输等的设备及工器具、生产用管道、食品接触面，应定期清洗和消毒。清洗和消毒作业时应注意防止污染食品、食品接触面及内包装材料。

7.2.3 已清洗和消毒过的可移动设备和用具，应放在能防止其食品接触面再受污染的适当场所，并保持适用状态。

7.3 清洁和消毒

7.3.1 应制定有效的清洁和消毒计划和程序，以保证食品加工场所、设备和设施等的清洁卫生，防止食品污染。

7.3.2 可根据产品和工艺特点选择清洁和消毒的方法。

7.3.3 用于清洁和消毒的设备、用具应放置在专用场所妥善保管。

7.3.4 应对清洁和消毒程序进行记录，如洗涤剂和消毒剂的品种、作用时间、浓度、对象、温度等。

7.4 人员健康与卫生要求

7.4.1 人员健康

7.4.1.1 企业应建立并执行从业人员健康管理制度。

7.4.1.2 乳制品加工人员每年应进行健康检查，取得健康证明后方可参加工作。

7.4.1.3 患有痢疾、伤寒、甲型病毒性肝炎、戊型病毒性肝炎等消化道传染病的人员，以及患有活动性肺结核、化脓性或者渗出性皮肤病等有碍食品安全疾病的人员，以及皮肤有未愈伤口的人员，企业应将其调整到其他不影响食品安全的工作岗位。

7.4.2 个人卫生

7.4.2.1 乳制品加工人员应保持良好的个人卫生。

7.4.2.2 进入生产车间前，应穿戴好整洁的工作服、工作帽、工作鞋（靴）。工作服应盖住外衣，头发

食品伙伴网http://www.foodmate.net

不应露出帽外，必要时需戴口罩；不应穿清洁作业区、准清洁作业区的工作服、工作鞋（靴）进入厕所，离开生产加工场所或跨区域作业。

7.4.2.3 上岗前、如厕后、接触可能污染食品的物品后或从事与生产无关的其他活动后，应洗手消毒。生产加工、操作过程中应保持手部清洁。

7.4.2.4 乳制品加工人员不应涂指甲油，不应使用香水，不应佩戴手表及饰物。

7.4.2.5 工作场所严禁吸烟、吃食物或进行其他有碍食品卫生的活动。

7.4.2.6 个人衣物应贮存在更衣室个人专用的更衣柜内，个人用其他物品不应带入生产车间。

7.4.3 来访者

来访者进入食品生产加工、操作场所应符合现场操作人员卫生要求。

7.5 虫害控制

7.5.1 应制定虫害控制措施，保持建筑物完好、环境整洁，防止虫害侵入及孳生。

7.5.2 在生产车间和贮存场所的入口处应设捕虫灯（器），窗户等与外界直接相连的地方应当安装纱窗或采取其他措施，防止或消除虫害。

7.5.3 应定期监测和检查厂区环境和生产场所中是否有虫害迹象，若发现虫害存在时，应追查其来源，并杜绝再次发生。

7.5.4 可采用物理、化学或生物制剂进行处理，其灭除方法应不影响食品的安全和产品特性，不污染食品接触面及包装材料（如尽量避免使用杀虫剂等）。

7.6 废弃物处理

7.6.1 应制定废弃物存放和清除制度。

7.6.2 盛装废弃物、加工副产品以及不可食用物或危险物质的容器应有特别标识且要构造合理、不透水，必要时容器可封闭，以防止污染食品。

7.6.3 应在适当地点设置废弃物临时存放设施，并依废弃物特性分类存放，易腐败的废弃物应定期清除。

7.6.4 废弃物放置场所不应有不良气味或有害、有毒气体溢出，应防止虫害的孳生，防止污染食品、食品接触面、水源及地面。

7.7 有毒有害物管理

按照 GB 14881 有关规定执行。

7.8 污水、污物管理

7.8.1 污水排放应符合 GB 8978 的要求，不符合标准时应采取净化措施，达标后方可排放。

7.8.2 污物管理按照 GB 14881 有关规定执行。

7.9 工作服管理

按照 GB 14881 有关规定执行。

8 原料和包装材料的要求

8.1 一般要求

8.1.1 企业应建立与原料和包装材料的采购、验收、运输和贮存相关的管理制度，确保所使用的原料和包装材料符合法律法规的要求。不得使用任何危害人体健康和生命安全的物质。

8.1.2 企业自行建设的生乳收购站应符合国家和地方相关规定。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

8.2 原料和包装材料的采购和验收要求

8.2.1 企业应建立供应商管理制度，规定供应商的选择、审核、评估程序。

8.2.2 企业应建立原料和包装材料进货查验制度。

8.2.2.1 使用生乳的企业应按照相关食品安全标准逐批检验收购的生乳，如实记录质量检测情况、供货方的名称以及联系方式、进货日期等内容，并查验运输车辆生乳交接单。企业不应从未取得生乳收购许可证的单位和个人购进生乳。

8.2.2.2 其他原料和包装材料验收时，应查验该批原料和包装材料的合格证明文件（企业自检报告或第三方出具的检验报告）；无法提供有效的合格证明文件的，应按照相应的食品安全标准或企业验收标准对所购原料和包装材料进行检验，合格后方可接收与使用。应如实记录原料和包装材料的相关信息。

8.2.3 经判定拒收的原料和包装材料应予以标识，单独存放，并通知供货方做进一步处理。

8.2.4 如发现原料和包装材料存在食品安全问题时应向本企业所在辖区的食品安全监管部门报告。

8.3 原料和包装材料的运输和贮存要求

8.3.1 企业应按照保证质量安全的要求运输和贮存原料和包装材料。

8.3.2 生乳的运输和贮存

8.3.2.1 运输和贮存生乳的容器，应符合相关国家安全标准。

8.3.2.2 生乳在挤奶后 2 小时内应降温至 0℃～4℃。采用保温奶罐车运输。运输车辆应具备完善的证明和记录。

8.3.2.3 生乳到厂后应及时进行加工，如果不能及时处理，应有冷藏贮存设施，并进行温度及相关指标的监测，做好记录。

8.3.3 其他原料和包装材料的运输和贮存

8.3.3.1 原料和包装材料在运输和贮存过程应避免太阳直射、雨淋、强烈的温度、湿度变化与撞击等；不应与有毒、有害物品混装、混运。

8.3.3.2 在运输和贮存过程中，应避免原料和包装材料受到污染及损坏，并将品质的劣化降到最低程度；对有温度、湿度及其他特殊要求的原料和包装材料应按规定条件运输和贮存。

8.3.3.3 在贮存期间应按照不同原料和包装材料的特点分区存放，并建立标识，标明相关信息和质量状态。

8.3.3.4 应定期检查库存原料和包装材料，对贮存时间较长，品质有可能发生变化的原料和包装材料，应定期抽样确认品质；及时清理变质或者超过保质期的原料和包装材料。

8.3.4 合格原料和包装材料使用时应遵照“先进先出”或“效期先出”的原则，合理安排使用。

8.4 保存原料和包装材料采购、验收、贮存和运输记录。

9 生产过程的食品安全控制

9.1 微生物污染的控制

9.1.1 温度和时间

9.1.1.1 应根据产品的特点，规定用于杀灭微生物或抑制微生物生长繁殖的方法，如热处理，冷冻或冷藏保存等，并实施有效的监控。

9.1.1.2 应建立温度、时间控制措施和纠偏措施，并进行定期验证。

9.1.1.3 对严格控制温度和时间的加工环节，应建立实时监控措施，并保持监控记录。

9.1.2 湿度

9.1.2.1 应根据产品和工艺特点，对需要进行湿度控制区域的空气湿度进行控制，以减少有害微生物的

食品伙伴网http://www.foodmate.net

繁殖；制定空气湿度关键限值，并有效实施。

9.1.2.2 建立实时空气湿度控制和监控措施，定期进行验证，并进行记录。

9.1.3 生产区域空气洁净度

9.1.3.1 生产车间应保持空气的清洁，防止污染食品。

9.1.3.2 按GB/T 18204.1中的自然沉降法测定，清洁作业区空气中的菌落总数应控制在30CFU/皿以下。

9.1.4 防止微生物污染

9.1.4.1 应对从原料和包装材料进厂到成品出厂的全过程采取必要的措施，防止微生物的污染。

9.1.4.2 用于输送、装载或贮存原料、半成品、成品的设备、容器及用具，其操作、使用与维护应避免对加工或贮存中的食品造成污染。

9.1.4.3 加工中与食品直接接触的冰块和蒸汽，其用水应符合GB 5749的规定。

9.1.4.4 食品加工中蒸发或干燥工序中的回收水、以及循环使用的水可以再次使用，但应确保其对食品的安全和产品特性不造成危害，必要时应进行水处理，并应有效监控。

9.2 化学污染的控制

9.2.1 应建立防止化学污染的管理制度，分析可能的污染源和污染途径，并提出控制措施。

9.2.2 应选择符合要求的洗涤剂、消毒剂、杀虫剂、润滑油，并按照产品说明书的要求使用；对其使用应做登记，并保存好使用记录，避免污染食品的危害发生。

9.2.3 化学物质应与食品分开贮存，明确标识，并应有专人对其保管。

9.3 物理污染的控制

9.3.1 应通过采取设备维护、卫生管理、现场管理、外来人员管理及加工过程监督等措施，确保产品免受外来物(如玻璃或金属碎片、尘土等)的污染。

9.3.2 应采取有效措施（如设置筛网、捕集器、磁铁、电子金属检查器等）防止金属或其他外来杂物混入产品中。

9.3.3 不应在生产过程中进行电焊、切割、打磨等工作，以免产生异味、碎屑。

9.4 食品添加剂和食品营养强化剂

9.4.1 应依照食品安全标准规定的品种、范围、用量合理使用食品添加剂和食品营养强化剂。

9.4.2 在使用时对食品添加剂和食品营养强化剂准确称量，并做好记录。

9.5 包装材料

9.5.1 包装材料应清洁、无毒且符合国家相关规定。

9.5.2 包装材料或包装用气体应无毒，并且在特定贮存和使用条件下不影响食品的安全和产品特性。

9.5.3 内包装材料应能在正常贮存、运输、销售中充分保护食品免受污染，防止损坏。

9.5.4 可重复使用的包装材料如玻璃瓶、不锈钢容器等在使用前应彻底清洗，并进行必要的消毒。

9.5.5 在包装操作前,应对即将投入使用的包装材料标识进行检查，避免包装材料的误用，并予以记录，内容包括包装材料对应的产品名称、数量、操作人及日期等。

9.6 产品信息和标签

产品标签应符合GB 7718、相应产品国家标准及国家其它相关规定。

10 检验

10.1 企业可对原料和产品自行检验，也可委托获得食品检验机构资质的检验机构进行检验。自行检验

食品伙伴网http://www.foodmate.net

的企业应具备相应的检验能力。

10.2 应按相关标准对每批产品进行检验，并保留样品。

10.3 应加强实验室质量管理，确保检验结果的准确性和真实性。

10.4 应完整保存各项检验记录和检验报告。

11 产品的贮存和运输

11.1 应根据产品的种类和性质选择贮存和运输的方式，并符合产品标签所标识的贮存条件。

11.2 贮存和运输过程中应避免日光直射、雨淋、剧烈的温度、湿度变化和撞击等，以防止乳制品的成分、品质等受到不良的影响；不应将产品与有异味、有毒、有害物品一同贮存和运输。

11.3 用于贮存、运输和装卸的容器、工具和设备应清洁、安全，处于良好状态，防止产品受到污染。

11.4 仓库中的产品应定期检查，必要时应有温度记录和（或）湿度记录，如有异常应及时处理。

11.5 经检验后的产品应标识其质量状态。

11.6 产品的贮存和运输应有相应的记录，产品出厂有出货记录，以便发现问题时，可迅速召回。

12 产品追溯和召回

12.1 应建立产品追溯制度，确保对产品从原料采购到产品销售的所有环节都可进行有效追溯。

12.2 应建立产品召回制度。当发现某一批次或类别的产品含有或可能含有对消费者健康造成危害的因素时，应按照国家相关规定启动产品召回程序，及时向相关部门通告，并作好相关记录。

12.3 应对召回的食品采取无害化处理、销毁等措施，并将食品召回和处理情况向相关部门报告。

12.4 应建立客户投诉处理机制。对客户提出的书面或口头意见、投诉，企业相关管理部门应作记录并查找原因，妥善处理。

13 培训

13.1 应建立培训制度，对本企业所有从业人员进行食品安全知识培训。

13.2 应根据岗位的不同需求制定年度培训计划，进行相应培训，特殊工种应持证上岗。

13.3 应定期审核和修订培训计划，评估培训效果，并进行常规检查，以确保计划的有效实施。

13.4 应保持培训记录。

14 管理机构和人员

14.1 应建立健全本单位的食品安全管理制度，采取相应管理措施，对乳制品生产实施从原料进厂到成品出厂全过程的安全质量控制，保证产品符合法律法规和相关标准的要求。

14.2 应建立食品安全管理机构，负责企业的食品安全管理。

14.3 食品安全管理机构负责人应是企业法人代表或企业法人授权的负责人。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

14.4 机构中的各部门应有明确的管理职责，并确保与质量、安全相关的管理职责落实到位。各部门应有效分工，避免职责交叉、重复或缺位。对厂区内外环境、厂房设施和设备的维护和管理、生产过程质量安全管理、卫生管理、品质追踪等制定相应管理制度，并明确管理负责人与职责。

14.5 食品安全管理机构中各部门应配备经专业培训的专职或兼职的食品安全管理人员，宣传贯彻食品安全法规及有关规章制度，负责督查执行的情况并做好有关记录。

15 记录和文件的管理

15.1 记录管理

15.1.1 应建立相应的记录管理制度，对乳制品加工中原料和包装材料等的采购、生产、贮存、检验、销售等环节详细记录，以增加食品安全管理体系的可信性和有效性。

15.1.1.1 应如实记录食品原料、食品添加剂、食品相关产品的名称、规格、数量、供货者名称及联系方式、进货日期等内容。

15.1.1.2 应如实记录产品的加工过程（包括工艺参数、环境监测等）、产品贮存情况及产品的检验批号、检验日期、检验人员、检验方法、检验结果等内容。

15.1.1.3 应如实记录出厂产品的名称、规格、数量、生产日期、生产批号、发货地点、收货人名称及联系方式、发货日期等内容。

15.1.1.4 应如实记录发生召回的食品名称、批次、规格、数量、发生召回的原因及后续整改方案等内容。

15.1.2 各项记录均应由执行人员和有关督导人员复核签名或签章，记录内容如有修改，不能将原文涂掉以致无法辨认，且修改后应由修改人在修改文字附近签名或签章。

15.1.3 所有生产和品质管理记录应由相关部门审核，以确定所有处理均符合规定，如发现异常现象，应立即处理。

15.1.4 对本规范所规定的有关记录，保存期不应少于二年。

15.2 文件管理

15.2.1 应建立文件的管理制度，并建立完整的质量管理档案，文件应分类归档、保存。分发、使用的文件应为批准的现行文本。已废除或失效的文件除留档备查外，不应在工作现场出现。

15.2.2 鼓励企业采用先进技术手段（如电子计算机信息系统），进行文件和记录的管理。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附录 A
（资料性附录）
乳制品和婴幼儿配方食品生产企业计算机系统应用的有关要求

乳制品和婴幼儿配方食品生产企业的计算机系统应能满足《食品安全法》及其相关法律法规与标准对食品安全的监管要求，应形成从原料进厂到产品出厂在内各环节有助于食品安全问题溯源、追踪、定位的完整信息链，应能按照监管部门的要求提交或远程报送相关数据。该计算机系统应符合（但不限于）以下要求：

A.1 系统应包括原料采购与验收、原料贮存与使用、生产加工关键控制环节监控、产品出厂检验、产品贮存与运输、销售等各环节与食品安全相关的数据采集和记录保管功能。

A.2 系统应能对本企业相关原料、加工工艺以及产品的食品安全风险进行评估和预警。

A.3 系统和与之配套的数据库应建立并使用完善的权限管理机制，保证工作人员帐号/密码的强制使用，在安全架构上确保系统及数据库不存在允许非授权访问的漏洞。

A.4 在权限管理机制的基础上，系统应实现完善的安全策略，针对不同工作人员设定相应策略组，以确定特定角色用户仅拥有相应权限。系统所接触和产生的所有数据应保存在对应的数据库中，不应以文件形式存储，确定所有的数据访问都要受系统和数据库的权限管理控制。

A.5 对机密信息采用特殊安全策略确保仅信息拥有者有权进行读、写及删除操所。如机密信息确需脱离系统和数据库的安全控制范围进行存储和传输，应确保：

A.5.1 对机密信息进行加密存储，防止无权限者读取信息。
A.5.2 在机密信息传输前产生校验码，校验码与信息（加密后）分别传输，在接收端利用校验码确认信息未被篡改。

A.6 如果系统需要采集自动化检测仪器产生的数据，系统应提供安全、可靠的数据接口，确保接口部分的准确和高可用性，保证仪器产生的数据能够及时准确地被系统所采集。

A.7 应实现完善详尽的系统和数据库日志管理功能，包括：

A.7.1 系统日志记录系统和数据库每一次用户登录情况（用户、时间、登录计算机地址等）。
A.7.2 操作日志记录数据的每一次修改情况（包括修改用户、修改时间、修改内容、原内容等）。
A.7.3 系统日志和操作日志应有保存策略，在设定的时限内任何用户（不包括系统管理员）不能够删除或修改，以确保一定时效的溯源能力。

A.8 详尽制定系统的使用和管理制度，要求至少包含以下内容：

A.8.1 对工作流程中的原始数据、中间数据、产生数据以及处理流程的实时记录制度，确保整个工作过程能够再现。
A.8.2 详尽的备份管理制度，确保故障灾难发生后能够尽快完整恢复整个系统以及相应数据。
A.8.3 机房应配备智能 UPS 不间断电源并与工作系统连接，确保外电断电情况下 UPS 接替供电并通知工作系统做数据保存和日志操作（UPS 应能提供保证系统紧急存盘操作时间的电力）。
A.8.4 健全的数据存取管理制度，保密数据严禁存放在共享设备上；部门内部的数据共享也应采用权限管理制度，实现授权访问。
A.8.5 配套的系统维护制度，包括定期的存储整理和系统检测，确保系统的长期稳定运行。
A.8.6 安全管理制度，需要定期更换系统各部分用户的密码，限定部分用户的登录地点，及时删除不再

食品伙伴网http://www.foodmate.net

需要的帐户。

A.8.7 规定外网登录的用户不应开启和使用外部计算机上操作系统提供的用户/密码记忆功能，防止信息被盗用。

A.9 当关键控制点实时监测数据与设定的标准值不符时，系统能记录发生偏差的日期、批次以及纠正偏差的具体方法、操作者姓名等。

A.10 系统内的数据和有关记录应能够被复制，以供监管部门进行检查分析。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国国家标准

GB 13102—2010

食品安全国家标准

炼 乳

National food safety standard

Evaporated milk, sweetened condensed milk and formulated condensed milk

2010-03-26 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准对应于国际食品法典委员会(CAC)的标准 Codex Stan 281-1971(Revision 1999) Codex Standard for Evaporated Milks 和 Codex Stan 282-1971(Revision 1999) Codex Standard for Sweetened Condensed Milks，本标准与 Codex Stan 281-1971(Revision 1999)和 Codex Stan 282-1971(Revision 1999)的一致性程度为非等效。

本标准代替GB 13102-2005《炼乳卫生标准》以及GB/T 5417-2008《炼乳》中的部分指标，GB/T 5417-2008《炼乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与GB 13102-2005相比，主要变化如下：

——标准名称改为《炼乳》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官要求”；

——删除了杂质度指标；

——增加了水分指标；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——删除了志贺氏菌指标；

——增加了对营养强化剂的要求。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 13102-1991、GB 13102-2005。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

食品安全国家标准

炼 乳

1 范围

本标准适用于淡炼乳、加糖炼乳和调制炼乳。

2 规范性引用文件

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

3 术语和定义

3.1 淡炼乳 evaporated milk

以生乳和(或)乳制品为原料，添加或不添加食品添加剂和营养强化剂，经加工制成的粘稠状产品。

3.2 加糖炼乳 sweetened condensed milk

以生乳和(或)乳制品、食糖为原料，添加或不添加食品添加剂和营养强化剂，经加工制成的粘稠状产品。

3.3 调制炼乳 formulated condensed milk

以生乳和(或)乳制品为主料，添加或不添加食糖、食品添加剂和营养强化剂，添加辅料，经加工制成的粘稠状产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 生乳：应符合GB 19301的要求。

4.1.2 其它原料：应符合相应的安全标准和/或有关规定。

4.2 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求			检验方法
	淡炼乳	加糖炼乳	调制炼乳	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
色泽	呈均匀一致的乳白色或乳黄色，有光泽。		具有辅料应有的色泽。	
滋味、气味	具有乳的滋味和气味。	具有乳的香味，甜味纯正。	具有乳和辅料应有的滋味和气味。	
组织状态	组织细腻，质地均匀，粘度适中。			

食品伙伴网http://www.foodmate.net

4.3 理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标				检验方法
	淡炼乳	加糖炼乳	调制炼乳		
			调制淡炼乳	调制加糖炼乳	
蛋白质/(g/100g) ≥	非脂乳固体[a]的34%		4.1	4.6	GB 5009.5
脂肪(X)/(g/100g)	7.5≤X＜15.0		X≥7.5	X≥8.0	GB 5413.3
乳固体[b]/(g/100g) ≥	25.0	28.0	—	—	—
蔗糖/(g/100g) ≤	—	45.0	—	48.0	GB 5413.5
水分/(%) ≤	—	27.0	—	28.0	GB 5009.3
酸度/(°T) ≤	48.0				GB 5413.34

[a] 非脂乳固体(%)=100%－脂肪(%)－水分(%)－蔗糖(%)。

[b] 乳固体(%)=100%－水分(%)－蔗糖(%)。

4.4 污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.5 真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6 微生物要求

4.6.1 淡炼乳、调制淡炼乳应符合商业无菌的要求，按GB/T 4789.26规定的方法检验。

4.6.2 加糖炼乳、调制加糖炼乳应符合表3的规定。

表 3 微生物限量

项 目	采样方案[a]及限量（若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	2	30000	100000	GB 4789.2
大肠菌群	5	1	10	100	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	0	0 /25g(mL)	—	GB 4789.10 定性检验
沙门氏菌	5	0	0/25g(mL)	—	GB 4789.4

[a] 样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。

4.7 食品添加剂和营养强化剂

4.7.1 食品添加剂和营养强化剂质量应符合相应的安全标准和有关规定。

4.7.2 食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760 和 GB 14880 的规定。

5 其他

食品伙伴网http://www.foodmate.net

5.1 产品应标示“本产品不能作为婴幼儿的母乳代用品”或类似警语。

食品伙伴网http://www.foodmate.net