



# 中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××  
代替GB/T 5413.25—1997

## 婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定

Determination of inositol in foods for infants and young children,

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

## 前 言

本标准代替GB/T 5413.25—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 肌醇的测定》。

本标准与GB/T 5413.25—1997相比，第一法主要变化如下：

- 对菌种保藏培养基进行了纠正。
- 试样处理由盐酸蒸馏法改为盐酸高压水解法。
- 菌种接种方式由菌液与培养基混合后分装试管改为菌液向试管中滴加法。
- 对标准工作溶液的浓度做了调整。
- 灭菌温度由100℃调整为121℃。
- 增加了微孔板法。
- 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为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

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。

# 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。

本标准第一法、第二法检出限均为 20.0mg/kg。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准；然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

### 第一法 微生物法

## 3 原理

特定的微生物对某种营养物质具有极高的特异性和灵敏性，利用这种特异性可以定量测出试样中待测物质的含量。为了达到定量测定的目的，在测定用培养基中供给除待测物质以外的所有营养成分，这样微生物的生长就会同标准工作溶液及未知待测溶液中待测物质的含量相对应。以不同浓度标准溶液的透光率相对于各梯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待测物质的含量。

通过葡萄汁酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080) 的生长情况分析试样中肌醇含量。

## 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 cerevisiae* (ATCC 9080)。

### 4.2 肌醇标准品。

### 4.3 培养基

#### 4.3.1 麦芽浸粉琼脂培养基 (Malt Extract Agar)

##### 4.3.1.1 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℃)。

##### 4.3.1.2 制法：

先将除琼脂以外的其他成分溶解于水中，校正 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。

#### 4.3.2 肌醇测定培养基

##### 4.3.2.1 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℃)。

#### 4.3.2.2 制法:

将上述成分溶解于水中, 校正 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。

#### 4.4 9 g/L 氯化钠溶液:

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。

#### 4.5 1 mol/L 盐酸溶液:

量取 82.0 mL 浓盐酸 (37%, v/v) 溶于水中, 冷却后定容至 1000 mL。

#### 4.6 0.44 mol/L 盐酸溶液:

量取 36.6 mL 浓盐酸 (37%, v/v) 溶于水中, 冷却后定容至 1000 mL。

#### 4.7 600 g/L 氢氧化钠溶液:

称取 300 g 氢氧化钠溶解于水中, 冷却后定容至 500 mL。

#### 4.8 1 mol/L 氢氧化钠溶液:

称取 40 g 氢氧化钠溶解于水中, 冷却后定容至 1000 mL。

#### 4.9 肌醇标准溶液

##### 4.9.1 肌醇标准贮备液: 肌醇的浓度为 0.2 mg/mL。

肌醇标准品置于装有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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。

##### 4.9.2 肌醇标准中间液: 肌醇的浓度为 10 μg/mL。

吸取 5 mL 肌醇标准贮备液 (4.9.1) 用水定容到 100 mL, 贮存于冰箱。

##### 4.9.3 肌醇标准工作液: 肌醇的浓度为 1 μg/mL 和 2 μg/mL。

吸取 10 mL 肌醇标准中间液 (4.9.2) 两次, 分别用水定容到 100 mL 和 50 mL。该工作液需每次测定前现用现配。

#### 4.10 干燥剂: P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>。

#### 4.11 玻璃珠: 直径约 5 cm。

## 5 仪器和设备

### 5.1 分析天平: 感量 0.1 mg。

### 5.2 pH 计: 精密至 0.01。

### 5.3 分光光度计。

### 5.4 振荡培养箱。

### 5.5 旋涡混合器。

### 5.6 离心机: 2000 rpm。

## 6 分析步骤

### 6.1 接种菌悬液的制备

#### 6.1.1 贮备菌种:

将葡萄汁酵母菌 *S. cerevisiae* 菌株接种到 2 个以上已制备好的麦芽浸粉琼脂斜面培养基上 (4.3.1), 30℃ 培养 16~24 h 后, 贮于冰箱中, 保存期不要超过 2 周, 然后再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上, 30℃培养 16~24h。用接种环无菌地刮取菌苔到一支灭菌 9 g/L 氯化钠溶液试管(4.4)中, 得到菌体细胞的悬浊液。将该菌液以 2000 rpm 离心 2~3 min, 倾出上清液, 加入 10 mL 9 g/L 氯化钠溶液, 振荡混匀, 再离心 2~3 min, 如此清洗 3~4 次。在无菌条件下, 吸取一定量的该菌液移入装有 10 mL 9 g/L 氯化钠溶液的试管中, 此为接种菌悬液。

用分光光度计, 以 9 g/L 氯化钠溶液作空白, 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 60~80T%。

## 6.2 试样的处理

6.2.1 称取约含肌醇 0.5 mg~2 mg 的试样(精确到 0.1 mg)于 250 mL 三角瓶中, 对于粉状试样加入 80 mL 0.44 mol/L 盐酸(4.6), 对于液态试样加入 100 mL 0.44 mol/L 盐酸(4.6), 混匀, 使粉状试样溶解。

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 600 g/L 氢氧化钠溶液(4.7), 冷却。用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.8)或 1 mol/L 盐酸溶液(4.5)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 标准曲线的制备:

按表 1 顺序加入蒸馏水、肌醇标准工作液(4.9.3)和肌醇测定培养基(4.3.2)于培养管中, 一式三份。

表1

试管号, No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
蒸馏水, mL	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
标准工作液 1 μg/mL, mL	0	0	1	2	3	4	5	0	0	0
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 待测液的制备:

按表 2 顺序加入蒸馏水、待测液(6.2.2)和肌醇测定培养基(4.3.2)于培养管中, 一式三份。

表2

试管号, No.	1	2	3	4
蒸馏水, mL	4	3	2	1
待测液, mL	1	2	3	4
培养基, mL	5	5	5	5

## 6.5 灭菌:

每支试管内加入一粒玻璃珠(4.11), 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 1 滴(约 50 μL)(其中标准曲线管中的 No.1 除外)。

### 6.7 培养:

将试管固定在振荡培养箱内,用约 140-160 次/min 的振荡速度,在 28~30℃之间选择一个恒定温度(±0.5℃)振荡培养 22~24 h。

### 6.8 测定:

从振荡培养箱内取出试管,放入灭菌釜内,100℃蒸 5 min,使微生物停止生长。

若试管被任何外来微生物污染则测定无效。通过对每支试管的视觉检查进行反应的预测,未接种试管内培养液应是澄清的,标准工作液和待测液试管中应无其他微生物生长。

用未接种空白试管(No.1)作空白,将分光光度计透光率 T%调到 100%(或吸光度 A 为 0),读出接种空白试管(No.2)的读数。再以接种空白试管(No.2)为空白,调节透光率 T%为 100%(或 A 为 0),依次读出其他每支试管的透光率 T%(或吸光度 A)。

用旋涡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 540~660 nm,待读数稳定 30 s 后,读出透光率 T%,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 T%为纵坐标作标准曲线。

根据待测液的透光率 T%,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。

对每个水平的待测液的试管,用每支试管的透光率 T%计算该水平待测液肌醇的浓度,并计算该水平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±10%。如果符合该要求的管数少于所有的四种水平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。如果符合要求的管数是原来管数的 2/3 或更多,则可根据平均值计算试样中的肌醇含量。

注:1. 绘制标准曲线,既可读取透光率(T%),也可读取吸光度(A)。

2. 可以使用微孔板代替试管,用酶标仪进行测定。

## 7 结果计算和表示

试样中肌醇的含量以质量分数  $X$  计,数值以毫克每百克表示(mg/100g),按公式(1)计算:

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

式中:

$C_x$ ——每毫升待测液中肌醇含量的平均值,  $\mu\text{g}$ ;

$m$ ——试样的质量, g;

$F$ ——稀释因子。

计算结果以两次独立测定结果的算术平均值表示。计算结果保留至小数点后一位。

## 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%。

## 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 规定的三级水。

10.1 无水乙醇。

10.2 正己烷。

10.3 95%乙醇。

10.4 三甲基氯硅烷。

10.5 六甲基二硅胺烷。

10.6 NN 二甲基甲酰胺。

10.7 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，超声混匀备用。

10.8 肌醇标准溶液：0.010mg/ml。

称取 100mg（精确到 0.1 mg）经过 105℃，2 小时烘干的肌醇标准物质于 100mL 容量瓶中，用 25mL 水溶解完全。用 95%的乙醇定容至刻度。取 1mL 此溶液于 100mL 容量瓶中，用 70%的乙醇定容至刻度。

### 11 仪器和设备

11.1 分析天平：感量 0.1mg。

11.2 气相色谱仪：带 FID 检测器。

11.3 离心机：5000r/min 以上。

11.4 旋转蒸发仪。

11.5 超声波仪。

11.6 带有罗纹盖的 25mL 试管。

### 12 分析步骤

#### 12.1 试样处理与衍生

12.1.1 试样处理：称取混合均匀的固态试样 1g，液态试样 5g（精确到 0.1mg）于 50mL 容量瓶中，加入 12mL 约 40℃温水溶解试样。超声提取 5min，用 95%乙醇定容至刻度，混匀，静止 20 min 后。取 10mL 于 10mL 离心管中，以 4000r/min 离心 5min。取上清液 5mL 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 10mL 无水乙醇，在 80℃下旋转浓缩至近干时再加入 5mL 无水乙醇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（10.7）10mL，超声溶解 5min 并转移至 25mL 有罗纹盖的离心管中，放于 80℃水浴中衍生反应 75min。其间每隔约 20min 取出震荡一次，取出冷却至室温。加入 5mL 正己烷，振荡混合后静止分层，取上层液 3mL 于预先加少许无水硫酸钠的带罗纹盖离心管中，振荡后 4000r/min 离心，此为试样测定液。

#### 12.2 标准测定液的制备

分别吸取 0.0，2.0，4.0，6.0，8.0，10.0mL 肌醇标准溶液（10.8）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 60m, 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 $\mu$ m; 或同等性能的色谱柱。

进样口温度: 280 $^{\circ}$ C

检测器温度: 300 $^{\circ}$ C

分流比: 10: 1

进样量: 1.0 $\mu$ L

程序升温见表 1:

表 1 程序升温

升温速率 ( $^{\circ}$ C/ min)	目标温度 ( $^{\circ}$ C)	保持时间 ( min)
初始温度	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, 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 (mg) 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), 从标准曲线中查得试样测定液中肌醇的含量 (mg)。

## 13 结果计算和表示

试样中肌醇含量  $X$ , 以质量分数毫克每百克 (mg/100g) 表示, 按式 (2) 计算:

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

式中:

$C_s$ ——从标准曲线中查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。

以两次独立测定结果的算术平均值表示。计算结果要求表示到小数点后一位。

## 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%。



附录 A  
(资料性附录)  
标准及试样色谱图

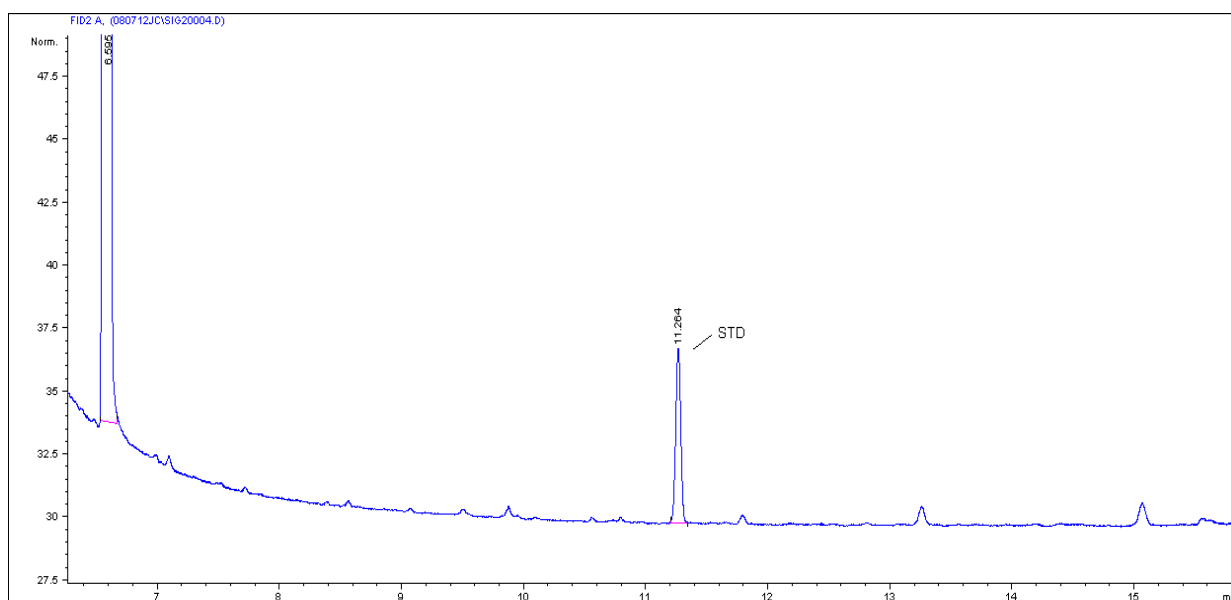


图 A.1 肌醇标准品衍生物色谱图

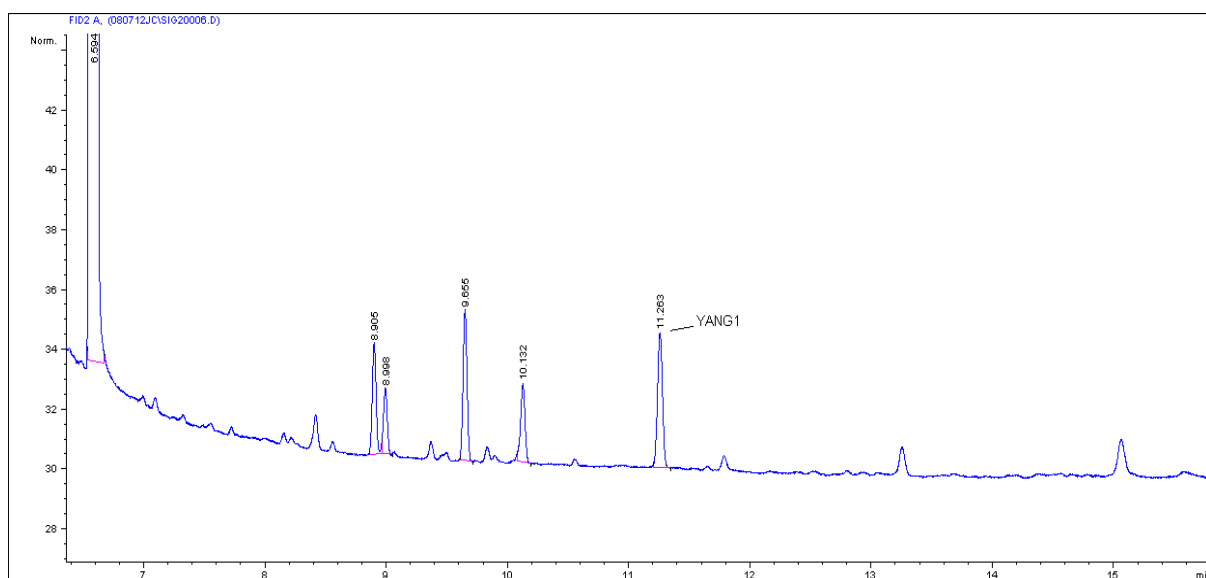


图 A.2 婴幼儿配方乳粉肌醇衍生物色谱图