

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA 435—2024

益生菌剂胃液耐受性检验方法

Inspection methods for resistance to gastric juice of probiotics cultures preparations

2024 - 01 - 22 发布

2024 - 03 - 01 实施

中国营养保健食品协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会、汤臣倍健股份有限公司、中国食品发酵工业研究院、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、中国检验检疫科学研究院综合检测中心、南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室、丹尼斯克（中国）有限公司、科汉森（北京）贸易有限公司、恒天然商贸（上海）有限公司、河北一然生物科技股份有限公司、通标标准技术服务有限公司、Life-Space Group Pty Ltd。

本文件主要起草人：连晓雷、李斌、赵溪、张旭光、刘明、郭海峰、金苏、杜凌、朱萧燕、王慧颖、杨潞芳、杨玲、陈军、古哈尔尼沙·格热提、毛跃建、陈玉新、李良、尚可、郭晶、张晓娜、赵静波、高晓旭、丘燕、陆歆瑶、滕堃如、路江浩、王园园、罗诗慧。

本文件是首次发布。

益生菌剂胃液耐受性检验方法

1 范围

本文件规定了益生菌剂在模拟胃液中的耐受性检验方法。

本文件适用于粉末状和颗粒状益生菌剂的胃液耐受性检验，其他菌剂的胃液耐受性检验参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文本必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用 水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

益生菌 probiotics

当摄入足够数量时，可以对人体起到有益健康作用的活的微生物。

3.2

益生菌剂 probiotics cultures preparations

一种或多种活性益生菌，经发酵、富集、乳化或不乳化、干燥或不干燥、添加或不添加辅料、混合或不混合、包装等工序制成的制剂。

3.3

胃液耐受性 resistance to gastric juice

益生菌剂在胃部环境中耐受胃液的程度，以益生菌经胃液处理后的活菌总数与初始活菌总数的比值表示。

4 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备和材料如下：

4.1 天平：感量 0.01 g。

4.2 pH 计：精确度 0.01，每次使用前需按照仪器说明书进行校准。

- 4.3 涡旋混合器。
- 4.4 恒温水浴锅：50 °C±2 °C。
- 4.5 拍击式均质器及无菌均质袋。
- 4.6 恒温培养箱：37 °C±2 °C。
- 4.7 容量瓶：10 mL、100 mL。
- 4.8 无菌试管：18 mm×180 mm 或 15 mm×150 mm。
- 4.9 微量移液器及无菌吸头：1 mL、5 mL。
- 4.10 无菌注射器。
- 4.11 针头过滤器：0.22 μM。
- 4.12 离心管：50 mL。
- 4.13 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 4.14 厌氧装置。

5 培养基和试剂

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合GB/T 6682中三级水的规格，所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯。分析中所用标准滴定溶液，杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。

- 5.1 氢氧化钠：CAS 号 1310-73-2。
- 5.2 浓盐酸（12 mol/L）：CAS 号 7647-01-0。
- 5.3 氯化钾：CAS 号 7447-40-7。
- 5.4 磷酸二氢钾：CAS 号 7778-77-0。
- 5.5 碳酸氢钠：CAS 号 144-55-8。
- 5.6 氯化钠：CAS 7647-14-5。
- 5.7 六水合氯化镁：CAS 号 7791-18-6。
- 5.8 碳酸铵：CAS 号 506-87-6。
- 5.9 二水合氯化钙：CAS 号 10035-04-8。
- 5.10 胰蛋白胨：CAS 号 73049-73-7。
- 5.11 L-半胱氨酸盐酸盐一水物：CAS 号 7048-04-6。
- 5.12 十二水合磷酸氢二钠：CAS 号 10039-32-4。
- 5.13 矿物油：CAS 号 8042-47-5。

6 试剂溶液

6.1 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取4.0 g氢氧化钠于烧杯中，加水并搅拌溶解，待溶液冷却到室温后用水定容至100 mL。

6.2 1 mol/L 盐酸溶液

移取8.3 mL浓盐酸溶于80 mL水中，再加水定容至100 mL。

6.3 电解质溶液 A

称取氯化钾0.064 g、磷酸二氢钾0.015 g、碳酸氢钠0.263 g、氯化钠0.345 g、六水合氯化镁0.003 g、碳酸铵0.006 g、1.5 g胰蛋白胨、0.05 g L-半胱氨酸盐酸盐一水物，加入95 mL蒸馏水充分溶解，用浓盐酸（5.2）或1 mol/L氢氧化钠溶液（6.1）调节pH至3.0，定容至100 mL，121 °C高压灭菌15 min。

6.4 电解质溶液 B

称取二水合氯化钙0.022 g，加水溶解并定容至100 mL，121 °C高压灭菌15 min。

6.5 溶解液

称取氯化钠8.5 g，L-半胱氨酸盐酸盐一水物0.5 g，加入1 000 mL蒸馏水充分溶解，分装后121 °C高压灭菌15 min。

7 检验步骤

益生菌剂胃液耐受性按图1所示步骤进行检验。

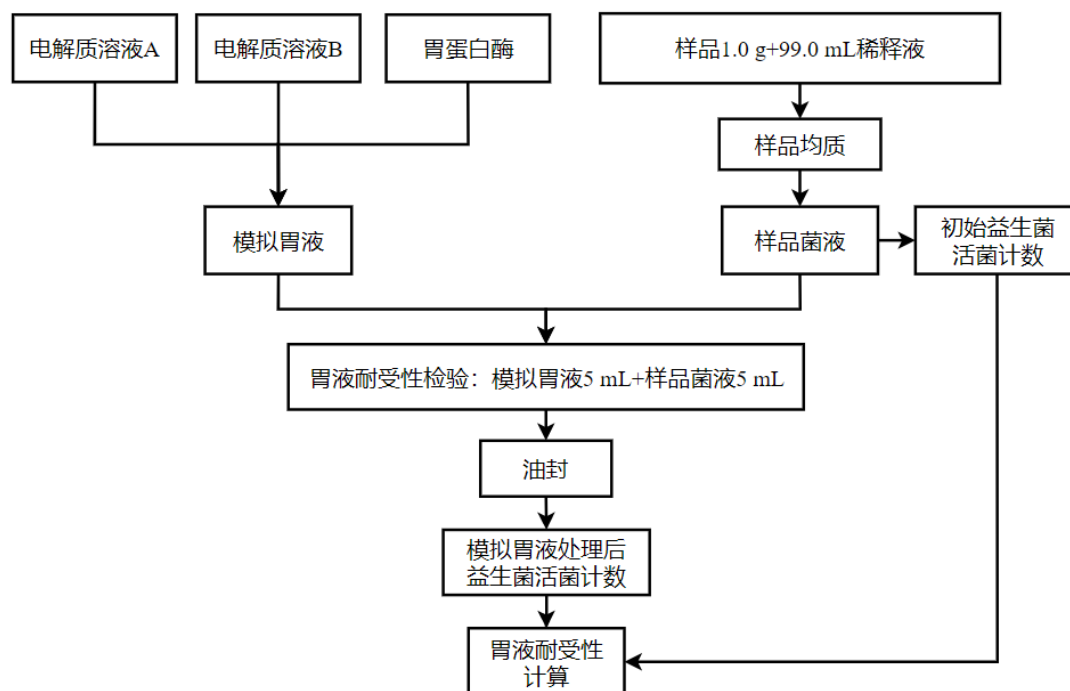


图1 益生菌剂胃液耐受性检验步骤

8 操作步骤

8.1 胃蛋白酶活力测定

按附录A方法测定胃蛋白酶活力。

8.2 胃液耐受性检验

8.2.1 模拟胃液条件选择

根据益生菌剂样品特点和试验目的，可选择不同模拟胃液条件开展益生菌剂胃液耐受性检验，方法主要参数如表1所示。

表1 胃液耐受性检验方法主要参数

模拟胃液条件	pH 值	模拟胃液处理时间 (h)
标准模拟胃液	3.0	2.0
空腹模拟胃液	2.0	0.5
饱腹模拟胃液	4.0	3.0

8.2.2 检验步骤

8.2.2.1 取 8.0 mL 电解质溶液 A (6.3) 和 1.0 mL 电解质溶液 B (6.4) 于烧杯中，添加相当于 4 000 U 的胃蛋白酶，根据表 1 选择一种模拟胃液条件，利用 1 mol/L 盐酸溶液 (6.2) 或 1 mol/L 氢氧化钠溶液 (6.1) 调节 pH 值，定容至 10 mL，混匀后经 0.22 μm 无菌滤膜过滤制备模拟胃液，现配现用。

8.2.2.2 以无菌操作称取 1.0 g 样品，置于装有 99 mL 溶解液 (6.5) 的无菌均质袋中，充分混匀后，以 10 次/秒通过均质器拍打 2 min，直至样品分散均匀，制备成样品菌液，现配现用。

8.2.2.3 按附录 B 测定样品菌液 (8.2.2.2) 活菌总数，记为 N_1 。

8.2.2.4 取 5.0 mL 模拟胃液 (8.2.2.1) 和 5.0 mL 样品菌液 (8.2.2.2) 于 50 mL 离心管中，涡旋混匀，用胶头滴管在溶液上方缓慢加入约 5 mL 矿物油，使溶液上方形成油封层。

8.2.2.5 根据 8.2.2.1 步骤选择的模拟胃液条件，将离心管置于 37 °C 恒温水浴锅培养规定的处理时间，利用胶头滴管移除矿物油，按附录 B 测定活菌总数，记为 N_1' 。

8.2.2.6 重复步骤 8.2.2.1-8.2.2.5 完成两次胃液耐受性检验，其中 8.2.2.3 步骤中活菌总数测定结果记为 N_2 和 N_3 ，8.2.2.5 步骤中活菌总数测定结果记为 N_2' 和 N_3' 。

8.2.2.7 计算 8.2.2.3 步骤 (N_1 、 N_2 和 N_3) 和 8.2.2.5 步骤 (N_1' 、 N_2' 和 N_3') 活菌总数测定结果的相对平均偏差，两组数据的相对平均偏差均应不大于 15%，否则应重新完成胃液耐受性检验。

8.2.3 胃液耐受性计算

胃液耐受性按式 (1) 计算：

$$A = \left(\frac{N_1' \times 2}{N_1} + \frac{N_2' \times 2}{N_2} + \frac{N_3' \times 2}{N_3} \right) \times \frac{1}{3} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A ——胃酸耐受性，用百分率 (%) 表示；

N_1 ——第一次胃液耐受性检验初始活菌总数，单位为 CFU/mL；

N_2 ——第二次胃液耐受性检验初始活菌总数，单位为 CFU/mL；

N_3 ——第三次胃液耐受性检验初始活菌总数，单位为 CFU/mL；

N_1' ——第一次胃液耐受性检验处理后活菌总数，单位为 CFU/mL；

N_2' ——第二次胃液耐受性检验处理后活菌总数，单位为 CFU/mL；

N_3' ——第三次胃液耐受性检验处理后活菌总数，单位为 CFU/mL；

2 ——稀释倍数换算系数；

1/3 ——三次平行数据取平均值；

计算结果表示至整数。

9 报告

- 9.1 应根据模拟胃液实验条件，报告益生菌胃液耐受性，结果以保留整数形式表示，报告单位为%。
- 9.2 若胃液耐受性检验的模拟胃液 pH 值为 3.0，应报告“标准胃液 pH3.0 耐受性××%”。
- 9.3 若胃液耐受性检验的模拟胃液 pH 值为 2.0，应报告“空腹胃液 pH2.0 耐受性××%”。
- 9.4 若胃液耐受性检验的模拟胃液 pH 值为 4.0，应报告“饱腹胃液 pH4.0 耐受性××%”。

附 录 A

（规范性）

胃蛋白酶活力测定方法

A.1 一般规定

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合GB/T 6682-2008中水的规格。所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯。分析中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。

A.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

胃蛋白酶活力 activity unit of pepsin

在37 °C和pH2.0条件下，胃蛋白酶水解血红蛋白产生可溶性酪氨酸肽，在280 nm吸光度条件下每分钟吸光值变化0.001，即为1个酶活力单位，用U/mg表示。

A.3 设备和材料

- A.3.1. 天平：感量0.01 g。
- A.3.2. pH计：精确度0.1，每次使用前需按照仪器说明书进行校准。
- A.3.3. 恒温水浴锅：(37±1) °C。
- A.3.4. 离心机：离心力6 000 ×g。
- A.3.5. 分光光度计：波长280 nm。

A.4 试剂

- A.4.1. 血红蛋白：CAS号9008-02-0。
- A.4.2. 三氯乙酸：CAS号76-03-9。
- A.4.3. 胃蛋白酶：CAS号9001-75-6。
- A.4.4. 三羟甲基氨基甲烷：CAS号77-86-1。

A.5 溶液配制

A.5.1. 2%血红蛋白溶液

称取0.2 g血红蛋白（A.4.1），加水溶解并定容至10 mL，用1 mol/L氢氧化钠溶液（6.1）或1 mol/L盐酸溶液（6.2）调节pH至2.0，现配现用。

A.5.2. 5%三氯乙酸溶液

称取5.0 g三氯乙酸（A.4.2），加水溶解并定容至100 mL。

A.5.3. 10 mM 盐酸溶液

移取0.1 mL 1 M 盐酸溶液（6.2），加水定容至100 mL。

A.6 检验方法

A.6.1. 原理

胃蛋白酶在37℃和pH2.0条件下，水解血红蛋白底物产生可溶性酪氨酸肽，能溶解于三氯乙酸，用分光光度计于波长280 nm处测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成正比，由此可以计算胃蛋白酶酶活力。

A.6.2. 样品测定

A.6.2.1. 胃蛋白酶溶液的制备

称取0.1 g 胃蛋白酶，0.12 g 三羟甲基氨基甲烷，0.88 g 氯化钠，加入80 mL 蒸馏水充分溶解，用1 mol/L 氢氧化钠溶液（6.1）或1 mol/L 盐酸溶液（6.2）调节pH至6.5，定容至100 mL。使用前利用10 mM 盐酸溶液（A.5.3）将胃蛋白酶稀释至20 μg/mL，现配现用。

A.6.2.2. 样品测定

A.6.2.2.1. 量取100 μL 胃蛋白酶溶液（A.6.2.1）于2 mL 离心管中，加入1 mL 5% 三氯乙酸溶液（A.5.2），涡旋30 s，再加入500 μL 2% 血红蛋白溶液（A.5.1），37℃水浴10 min。

A.6.2.2.2. 量取500 μL 2% 血红蛋白溶液（A.5.1）和100 μL 胃蛋白酶溶液（A.6.2.1）于2 mL 离心管中混合，37℃水浴10 min，加入1 mL 5% 三氯乙酸溶液（A.5.2）涡旋30 s，终止反应。

A.6.2.2.3. 将A.6.2.2.1和A.6.2.2.2的离心管于6 000 ×g离心30 min。

A.6.2.2.4. 在280 nm 波长处，用10 mm 比色皿测定A.6.2.2.1的空白吸光度 A_0 和A.6.2.2.2的吸光度 A_1 。

A.6.2.3. 计算

胃蛋白酶的酶活力按式（A.1）计算：

$$X_1 = \frac{(A_1 - A_0) \times 1000}{t \times X} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

X_1 ——胃蛋白酶的酶活力，单位为酶活力单位每毫克（U/mg）；

A_0 ——溶液的空白吸光度；

A_1 ——胃蛋白酶溶液的吸光度；

X ——最终反应混合物中胃蛋白酶的浓度（mg/mL）；

t ——反应时间，单位为分（min）。

计算结果表示至整数。

附录 B

(规范性)

益生菌活菌总数测定

B.1 一般规定

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合GB/T 6682-2008中水的规格。所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯。分析中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。

B.2 设备和材料

同4。

B.3 培养基和试剂

B.3.1. 磷酸缓冲盐溶液（PBS 缓冲液）：称取氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g、十二水合磷酸氢二钠 1.44 g、磷酸二氢钾 0.24 g，加入 900 mL 蒸馏水充分溶解，用 1 mol/L 盐酸溶液（6.2）或 1 mol/L 氢氧化钠溶液（6.1）调节 pH 至 7.4，定容至 1 000 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

注：可采用商品化试剂。

B.3.2. 稀释液：称取 8.5 g 氯化钠，15.0 g 胰蛋白胨，加入 1 000 mL 蒸馏水充分溶解，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

B.3.3. MRS 琼脂培养基：称取蛋白胨 10.0 g、牛肉浸粉 10.0 g、酵母浸粉 5.0 g、葡萄糖 20.0 g、吐温 80 1.0 mL、七水磷酸氢二钾 2.0 g、三水乙酸钠 5.0 g、柠檬酸三铵 2.0 g、七水硫酸镁 0.1 g、四水硫酸锰 0.05 g、琼脂粉 15.0 g，加入 1 000 mL 蒸馏水，加热溶解，室温下用 1 mol/L 氢氧化钠溶液（6.1）或 1 mol/L 盐酸溶液（6.2）调节 pH 至 6.2 ± 0.2 ，分装至锥形瓶中，121 °C 高压灭菌 15 min。

注：可采用商品化试剂。

B.3.4. TOS 丙酸盐琼脂培养基：称取酪蛋白胰酶消化物 10.0 g、酵母浸粉 1.0 g、磷酸二氢钾 3.0 g、磷酸氢二钾 4.8 g、硫酸铵 3.0 g、七水硫酸镁 0.2 g、L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g、丙酸钠 15.0 g、低聚半乳糖 10.0 g、琼脂粉 15.0 g，加入 1 000 mL 蒸馏水，加热溶解，室温下用 1 mol/L 氢氧化钠溶液（6.1）或 1 mol/L 盐酸溶液（6.2）调节 pH 至 6.7 ± 0.2 ，分装至锥形瓶中，115 °C 高压灭菌 15 min。

注：可采用商品化试剂。

B.4 稀释步骤

B.4.1. 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于装有 9 mL 磷酸缓冲盐溶液（B.3.1）的无菌试管中（注意吸管或微量移液器吸头尖端不要触及溶液），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 1:10 的样品匀液。

B.4.2. 另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于装有 9 mL 稀释液（B.3.2）的无菌试管中（注意吸管或微量移液器吸头尖端不要触及溶液），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。

B.4.3. 另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头，按 B.4.2 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 无菌吸管或微量移液器吸头。

B.5 活菌总数检验

B.5.1. 检验方法

活菌总数检验方法见附表B.1。

附表 B.1 活菌总数计数培养条件的选择及结果说明

样品中含有的种属类别	检验方法
仅包含乳杆菌属	按照 B.5.2 操作，结果即为活菌总数
仅包含双歧杆菌属	按照 B.5.3 操作，结果即为活菌总数
同时包括乳杆菌属+双歧杆菌属	1) 按照 B.5.2 操作，结果即为活菌总数； 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目，按照 B.5.3 (TOS 丙酸盐琼脂培养基中需加入 50 µg/mL 的莫匹罗星锂盐) 操作
注：其他菌种的检测方法可参考相关标准。	

B.5.2. 乳杆菌计数

根据样品活菌总数范围，选择合适的稀释度试管，分别吸取 1.0 mL 样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个无菌平皿；同时分别吸取 1.0 mL 磷酸缓冲盐溶液 (B.3.1) 和 1.0 mL 稀释液 (B.3.2) 于无菌平皿内作空白对照。将约 15 mL 冷却至 50 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注至无菌平皿中，顺时针或逆时针转动无菌平皿至少 20 次使其混合均匀，待琼脂凝固后，将平板翻转，37 °C±2 °C 厌氧培养 48 h±2 h。若菌落无生长或生长较小可选择培养至 72 h，培养后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。

B.5.3. 双歧杆菌计数

根据样品活菌总数范围，选择合适的稀释度试管，分别吸取 1.0 mL 样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个无菌平皿；同时分别吸取 1.0 mL 磷酸缓冲盐溶液 (B.3.1) 和 1.0 mL 稀释液 (B.3.2) 于无菌平皿内作空白对照。将约 15 mL 冷却至 50 °C 的 TOS 丙酸盐琼脂培养基倾注至无菌平皿中，顺时针或逆时针转动无菌平皿至少 20 次使其混合均匀，待琼脂凝固后，将平板翻转，37 °C±2 °C 厌氧培养 48 h±2 h。若菌落无生长或生长较小可选择培养至 72 h，培养后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。

B.6 结果计算

B.6.1. 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU、无蔓延菌落生长的平板计算益生菌活菌总数，每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

B.6.2. 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，作为每毫升样品中的菌数结果。

B.6.3. 若有两个连续稀释度的平板上菌落数在适宜计数范围内时，按公式 (B.1) 计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

N ——样品中益生菌活菌总数，单位为（CFU/mL）；

$\sum C$ ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和，单位为（CFU）；

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）。