ICS 67.040
CCS X 60

团　　体　　标　　准

T/CNHFA xxx—202X

益生菌剂胃液耐受性评价方法

Evaluation methods for resistance to gastric juice of probiotics cultures preparations

（征求意见稿）

202X - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 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××××××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: 略。

本文件主要起草人：略。

本文件是首次发布。

益生菌剂胃液耐受性评价方法

1 范围

本文件规定了益生菌剂在模拟胃液中的耐受性评价方法，其他菌剂可参考本方法执行。

本文件适用于粉末状、颗粒状等益生菌剂的胃液耐受性评价。

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

当摄取足够数量时，能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0.1，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±1）℃。

4.5 拍击式均质器及无菌均质袋。

4.6 恒温震荡水浴锅：（37±2）℃。

4.7 恒温培养箱：（37±2）℃。

4.8 容量瓶：10 mL、100 mL。

4.9 无菌试管：18 mm×180 mm或15 mm×150 mm。

4.10 微量移液器及无菌吸头：1 mL、5 mL。

4.11 无菌注射器。

4.12 针头过滤器：0.22 μM。

4.13 离心管：50 mL。

4.14 无菌培养皿：直径90 mm。

4.15 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 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 蒸馏水溶解后，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 100.0mL，121 ℃高压灭菌 15 min~20 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 100.0 mL，121 ℃高压灭菌 15 min~20 min。

6.5 稀释液

称取 8.5 g 氯化钠，加入 1 000 mL 蒸馏水充分溶解，分装后 121 ℃高压灭菌 15 min~20 min。。

7 评价步骤

益生菌剂胃液耐受性按图1所示步骤进行检验。

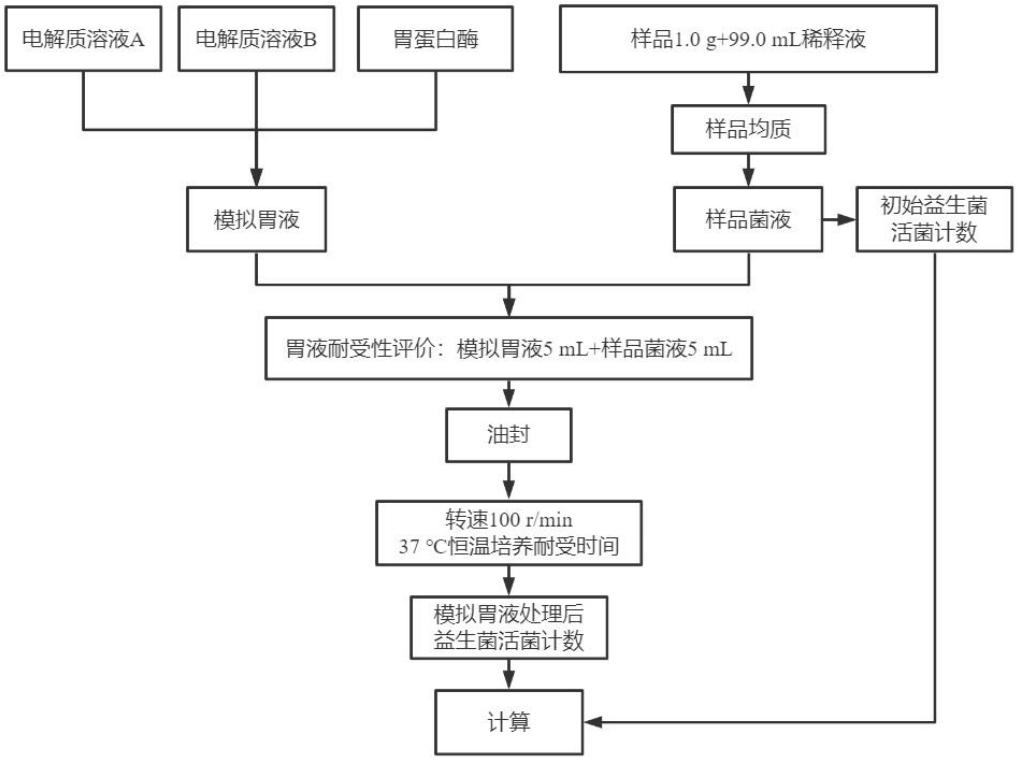

图1 益生菌剂胃液耐受性评价步骤

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 胃液耐受性评价

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评价，方法主要参数如表1所示。

表1 胃液耐受性评价方法主要参数

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 模拟胃液耐受性评价方法

8.2.2.1 模拟胃液制备

量取8.0 mL电解质溶液A（6.3）和1.0 mL电解质溶液B（6.4）于50 mL离心管中，并根据8.1测定结果添加相当于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）调节模拟胃液pH值，再加入1.0 mL蒸馏水，涡旋混匀后，经0.22μm无菌滤膜过滤除菌，现配现用。

8.2.2.2 样品菌液制备

以无菌操作称取 1.0 g 样品，置于装有 99 mL 稀释液（6.5）的无菌均质袋中，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。

8.2.2.3 样品测定

8.2.2.3.1 按附录 B 测定样品菌液（8.2.2.2）初始益生菌活菌总数，记为 N_1。

8.2.2.3.2 吸取 5.0 mL 模拟胃液（8.2.2.1）和 5.0 mL 样品菌液（8.2.2.2），混合均匀后制备成模拟消化液。

8.2.2.3.3 用胶头滴管向模拟消化液（8.2.2.3.2）中缓慢加入约 5 mL 矿物油，使溶液上方形成油封层用于隔绝氧气。

8.2.2.3.4 根据 8.2.2.1 步骤中选择的模拟胃液条件，将试管倾斜约 45° 置于转速 100 r/min 的 37℃恒温震荡水浴锅培养规定的处理时间后，利用胶头滴管移除矿物油，按附录 B 测定模拟消化液（8.2.2.3.2）的模拟胃液处理后益生菌活菌总数，记为 N_1'。

8.2.2.3.5 根据 8.2.2.1 步骤中选择的模拟胃液条件，重复步骤 8.2.2.1-8.2.2.3 分别完成两次模拟胃液耐受性评价，初始益生菌活菌总数分别记为 N_2 和 N_3，模拟胃液处理后益生菌活菌总数分别记为 N_2’和 N_3’。

8.2.2.3.6 计算初始益生菌活菌总数（N_1、N_2和N_3）和模拟胃液处理后益生菌活菌总数（N_1'、N_2'和N_3'）的相对标准偏差，两组数据的相对标准偏差均应不大于30%，否则应重新完成胃液耐受性评价。

8.2.3 胃液耐受性计算

胃液耐受性按式（1）计算：

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

式中：

A——胃液耐受性，用百分率（%）表示；

N_1——第一次胃液耐受性评价初始益生菌活菌总数，单位为CFU/mL；

N_2——第二次胃液耐受性评价初始益生菌活菌总数，单位为CFU/mL；

N_3——第三次胃液耐受性评价初始益生菌活菌总数，单位为CFU/mL；

N_1'——第一次胃液耐受性评价模拟胃液处理后益生菌活菌总数，单位为CFU/mL；

N_2'——第二次胃液耐受性评价模拟胃液处理后益生菌活菌总数，单位为CFU/mL；

N_3'——第三次胃液耐受性评价模拟胃液处理后益生菌活菌总数，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 若胃液耐受性评价的模拟胃液pH值为3.0，应报告“标准胃液pH3.0耐受性××%”。

9.3 若胃液耐受性评价的模拟胃液pH值为2.0，应报告“空腹胃液pH2.0耐受性××%”。

9.4 若胃液耐受性评价的模拟胃液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 ℃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）℃。

A.3.4 离心机：转速 8 000 r/min。

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 M氢氧化钠溶液（6.1）或1 M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 mL1 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，加水溶解并定容至100 mL，用1 M氢氧化钠溶液（6.1）或1 M盐酸溶液（6.2）调节pH至6.5。使用前，利用10 mM盐酸溶液（A.4.3）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 mL5%三氯乙酸溶液（A.5.2），涡旋 1 min，再加入 500 μL2%血红蛋白溶液（A.5.1）。

A.6.2.2.2　量取 500 μL2%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 mL5%三氯乙酸溶液（A.5.2）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 8 000 r/min离心 30 min。

A.6.2.2.4　在 280 nm波长处，用l0 mm比色皿测定A.6.2.2.1 的空白吸光度A0 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：

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

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 稀释液：同 6.5。

B.3.2 MRS（Man Rogosa Sharpe）培养基：称取蛋白胨 10.0 g、牛肉浸粉 5.0 g、酵母浸粉 4.0 g、葡萄糖 20.0 g、吐温 80 1.0mL、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 0.2 g、四水硫酸锰 0.05 g、琼脂粉 15.0 g，加入 1 000 mL蒸馏水，室温下用 1 M氢氧化钠溶液（6.1）或 1 M盐酸溶液（6.2）调节pH至 6.2±0.2，分装至锥形瓶中，121 ℃高压灭菌 15 min~20 min。

注：MRS培养基可采用商品化试剂。

B.3.3 TOS丙酸盐琼脂（TOS Propionate Agar）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，室温下用 1 M氢氧化钠溶液（6.1）或 1 M盐酸溶液（6.2）调节pH至 6.7±0.2，分装至锥形瓶中，115 ℃高压灭菌 15 min。

注：TOS丙酸盐琼脂培养基可采用商品化试剂。

B.4 益生菌活菌总数检验

B.4.1 检验规则

益生菌活菌总数检验规则见附表B.1。

附表 B.1 益生菌活菌总数检验规则

样品中含有的种属类别	检验方法
仅包含乳杆菌	按照 B.4.2 进行检验，结果即为益生菌活菌总数
仅包含双歧杆菌	按照 B.4.3 进行检验，结果即为益生菌活菌总数
乳杆菌+双歧杆菌	按照 B.4.2 和 B.4.3（TOS 丙酸盐琼脂培养基中需加入 50μg/mL 的莫匹罗星锂盐）进行检验，二者加和即为益生菌活菌总数
注：益生菌剂中其他菌种的检测方法可参考相关标准。	

B.4.2 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 空白稀释液（6.5）加入两个无菌平皿内作空白对照。将约 15 mL 冷却至 50 ℃的 MRS 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 ℃±2 ℃需氧培养 48 h±2 h。从样品梯度稀释到平板倾注要求在 20 min 内完成。

B.4.3 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 空白稀释液（6.5）加入两个无菌平皿内作空白对照。将约 15 mL 冷却至 50 ℃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 ℃±2 ℃厌氧培养 48 h±2 h。从样品梯度稀释到平板倾注要求在 20 min 内完成。

B.5 操作步骤

B.5.1 以无菌操作称取 10 g样品，置于装有 90 mL稀释液（6.5）的无菌均质袋中，以 10 次/秒通过均质器拍打 2 min，直至样品分散均匀。

B.5.2 用 1.0 mL微量移液器无菌吸头吸取样品菌液 1.0 mL，垂直注于装有 9.0 mL稀释液（6.5）的无菌试管中（注意吸管尖端不要触及稀释液），通过涡旋振荡器混匀（从试管内液体旋转至底部开始计时，振荡 10 s~15 s），制成 10 倍稀释的样品匀液；按上述操作顺序，做 10 倍递增稀释，每递增稀释一次，即换用 1 次 1.0 mL无菌吸头。

B.5.3 按照B.4 进行益生菌活菌总数检验。

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，作为每克样品中的菌数结果。

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：

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

式中：

N——样品中益生菌活菌总数，单位为（CFU/g 或 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）。