

微生物法测定乳清蛋白粉类样品中的叶酸含量

蔡晓霞*, 蔡伟江

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: 目的 建立微生物法测定乳清蛋白粉类样品中叶酸含量的分析方法。**方法** 利用叶酸标准品制作叶酸标准曲线。将样品进行超声处理得到样品溶液。试管中加入等体积的培养基和不同体积的样液, 稀释至 10 mL, 得到样品待测液。样品待测液和叶酸标准曲线溶液被灭菌后, 加入鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*) CICC 6224 菌悬液进行培养, 将培养物混匀后测其吸光度, 根据标准曲线计算相应的叶酸含量, 并进行方法的空白实验、检出限、精密度、重复性、稳定性及回收率实验。**结果** 叶酸标准曲线在 0.1010~1.0103 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数 $r^2=0.99373$, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求, 该方法的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 3.8%($n=6$), 平均回收率为 102.5%($n=3$)。

结论 该方法稳定、准确, 适用于测定乳清蛋白粉类样品中的叶酸含量。

关键词: 叶酸; 微生物法; 乳清蛋白粉

Determination of folic acid in whey protein powder samples by microbiological method

CAI Xiao-Xia*, CAI Wei-Jiang

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for content determination of folic acid in whey protein powder samples by microbiological method. **Methods** Folic acid standard curve was made from folic acid standard. The sample was sonicated to obtain the sample solution. In the test tube, equal volume medium and different volume sample solution were added and diluted to 10 mL to obtain the sample solution to be tested. Sample solution to be tested and folic acid standard curve solution were sterilized, then the suspension of *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* CICC6224 bacteria was added to culture, the absorbance value of the culture was measured after mixing the corresponding folic acid content was calculated according to the standard curve, and the blank test, limit of detection, degree of precision, repeatability, stability and recoveries of the method were carried out. **Results** The standard curve of folic acid was well linear in the range of 0.1010~1.0103 ng/mL, and the correlation of coefficient $r^2=0.99373$, which was in line with the requirements of GB/T 27404-2008 *laboratory quality control code*. The relative standard deviation of the method was 3.8% ($n=6$), and the recoveries was 102.5% ($n=3$). **Conclusion** The method is stable and accurate, which is suitable for content determination of folic acid in whey protein powder samples.

KEY WORDS: folic acid; microbiology method; whey protein powder

*通讯作者: 蔡晓霞, 检验员, 主要研究方向为食品质量安全与检测。E-mail: 1358154204@qq.com

*Corresponding author: CAI Xiao-Xia, Inspector, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1358154204@qq.com

1 引言

叶酸也被称为维生素 M, 其结构见图 1, 由蝶啶、对氨基苯甲酸和数量不等的谷氨酸 3 部分组成, 是一种重要的水溶性 B 族维生素, 参与核酸、蛋白质的生物合成, 与许多重要的生化过程密切相关, 在人体生长过程中发挥着重要作用^[1]。

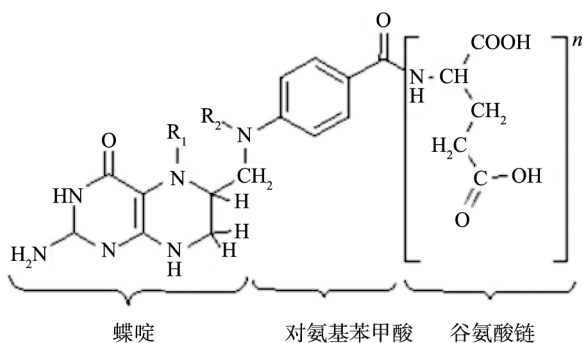


图 1 叶酸的结构

Fig.1 Structural formula of folic acid

人体中缺乏叶酸会导致胎儿先天性异常, 特别是神经管畸形的发生^[2]。另外, 叶酸可用于治疗由叶酸缺乏症引起的贫血, 也是孕妇的营养补充品, 但叶酸摄入不宜过多, 有研究表明, 摄入过量的维生素会引发中毒^[3], 因此, 对于保健食品中叶酸含量的检测准确性提出了较高的要求。目前已有多种检测样品中叶酸的方法, 如薄层层析法、化学发光测定法^[4]、气相色谱-质谱法、高效液相色谱法^[5-7]、微生物法^[8]、荧光法^[9-11]和酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[12,13]等。其中微生物分析法, 以其经典、准确可靠性^[14]成为许多国际标准方法机构的标准方法^[15]。我国现行的食品叶酸的检测标准为 GB 5009.211-2014《食品中叶酸的测定》^[16], 其优点是成本低, 可操作性强, 能够检测到极低浓度的叶酸, 结果一般为总的叶酸量。本研究采用微生物法测定乳清蛋白粉类样品中叶酸的含量, 利用鼠李糖乳杆菌(CICC 6224)对叶酸具有高灵敏度的特点, 通过其生长情况测定乳清蛋白粉类样品的叶酸含量, 以期为叶酸的测定提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

鼠李糖乳杆菌菌种(编号: CICC 6224, 广东省微生物菌种保藏中心); 叶酸对照品(批号 139092, 纯度 91.3%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 乳酸杆菌肉汤培养基、叶酸测定用培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);

L(+)-抗坏血酸、乙醇、氢氧化钠、氯化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 健乐多乳清蛋白营养强化粉固体饮料巧克力味(批号: 20200201A, 汤臣倍健股份有限公司)。

P300H 超声仪(德国 Elma 公司); UV2600 紫外分光光度计(日本岛津公司); AL-204 电子分析天平(梅特勒-托利多科学仪器有限公司); BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); BSC-1600-II-A2 生物安全柜(苏州市华宇净化设备有限公司); SPX-250BSH-II 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

参照 GB 5009.211-2014^[16]中 3.5 标准溶液的配制要求, 依次配制浓度为 22.4500 μg/mL 的叶酸标准储备液、0.2021 μg/mL 的叶酸标准中间液和 0.2021 ng/mL 的叶酸标准工作液, 待用。

2.2.2 工作菌液的制备

将鼠李糖乳杆菌冻干菌株连续传种至 3 代后接种到已灭菌的叶酸测定培养基进行饥饿培养, 并将饥饿培养完的菌液制备成甘油冷冻管, 作为工作菌株, 于 -80 °C 保存。

每次实验前取出 1 支工作菌株(甘油冷冻管), 将其全部转移至 10 mL 的无菌生理盐水中, 混匀后, 作为接种液。

2.2.3 试样的处理

精密称取试样 1.5 g, 转入 250 mL 锥形瓶中, 加入 80 mL 氢氧化钠乙醇溶液, 具塞, 超声振荡 50 min 至试样完全溶解或分散, 冷却后转移至 250 mL 容量瓶, 用水定容至刻度。

准确吸取 1.0 mL 试样提取液加入到 100 mL 容量瓶, 用水定容至刻度, 摇匀, 使试样稀释液中叶酸含量在 0.1~0.8 ng/mL 范围内, 所有操作均避免进行。

2.2.4 叶酸标准曲线的制备

按表 1 顺序加入水、标准曲线工作液和叶酸测定培养基于培养管中。

表 1 标准曲线的制作

Table 1 Preparation of standard curve

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
水/mL	5	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1	0
标准曲线工作液 0.2021 ng/mL	0	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	4	5
培养基/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

2.2.5 待测液的制备

按表 2 顺序加入水、试样溶液和叶酸测定培养基于培养管中。

表 2 待测液的制作
Table 2 Preparation of solution to be tested

试管号	1	2	3
水/mL	4.5	4	3
样品溶液/mL	0.5	1	2
培养基/mL	5	5	5

将标准曲线系列管和待测液系列管进行灭菌、接种菌液、并于(36±1) °C培养 40 h 后, 在 550 nm 处测定其吸光度, 根据得到的叶酸标准曲线回归方程计算出样品中叶酸的含量, 计算公式为:

$$X = \frac{C_x \times V \times f \times 100}{M \times 1000}$$

式中: X—试样中叶酸含量, µg/100 g; C_x—试样溶液中叶酸总平均浓度, ng/mL; M—试样的质量, g; V—试样提取液定容体积, mL; f—试样提取液稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 空白实验

按照 2.2.2 中试样处理方法制备 10 支标准溶液空白管 S2, 接种同样的菌液并培养 40 h 后, 以纯化水调零, 平行测定 10 支标准溶液空白管的吸光度, 记录见表 3。

该方法的吸光度空白值约为 0.0449, 即叶酸测定培养基中含有痕量叶酸, 这对标准溶液和样液的紫外测定结果有一定的影响, 因此, 每次都该标准溶液空白管调零, 后再进行标准曲线和样液的紫外吸光度测定。

3.2 标准曲线结果分析

3.2.1 标准工作曲线

以标准系列管中叶酸浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 利用 Lab Solution 软件拟合叶酸标准曲线见图 2。由图 2 可知, 叶酸标准曲线方程为 $Y = -1.77847X^2 + 3.50626X - 0.140989$, 相关系数 r^2 为 0.99373, 在浓度为 0.1010~1.0103 ng/mL 之间, 叶酸标准曲线线性良好, 可用于乳清蛋白粉类样品中叶酸含量的测定。

表 3 空白实验结果
Table 3 Experimental results of blanks

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
吸光度	0.0497	0.0448	0.0456	0.0409	0.0422	0.0442	0.0463	0.0441	0.0482	0.0429
平均吸光度	0.0449									

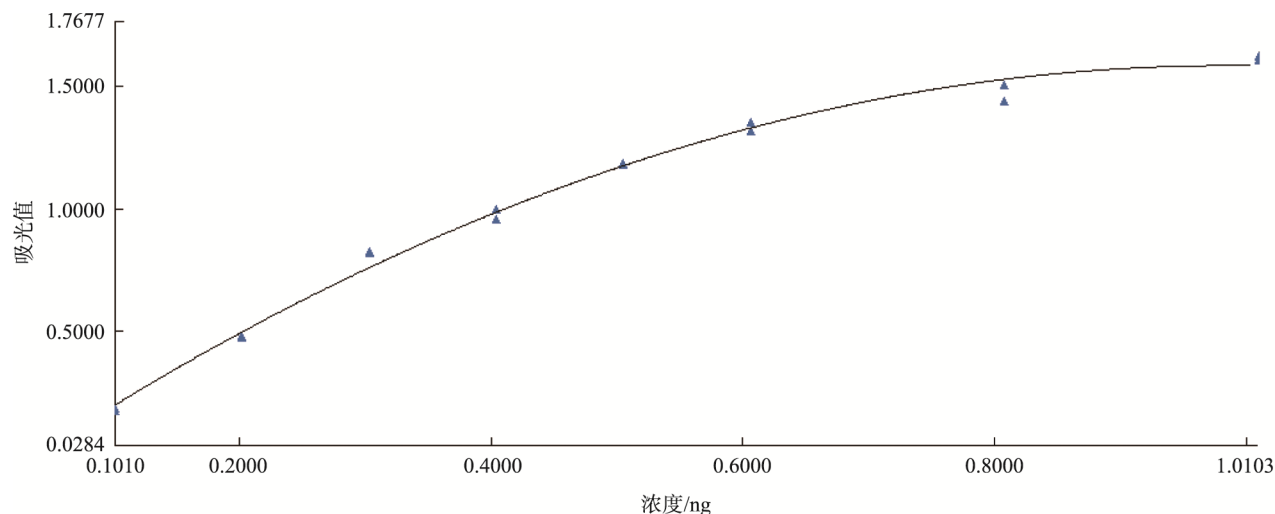


图 2 叶酸标准曲线图
Fig.2 Standard curve of folic acid

3.3 检出限

按照 3.1 的处理方法制备 20 支标准曲线空白管(S2), 培养后平行测定其吸光度, 根据 3.2.1 得到的标准曲线方程计算对应的叶酸浓度, 得到 20 次测定的平均浓度为 0.0458 ng/mL, 即该方法的空白试剂中叶酸浓度为 0.0458 ng/mL, 当样液中叶酸浓度低于该浓度时, 样品中的叶酸会被空白试剂所掩盖而不能准确检出, 因此, 以该浓度换算样品中叶酸含量, 即在本实验条件下, 样品称样量为 1.5 g, 稀释倍数为 25000 倍时, 利用现制测试菌液进行测定, 该方法的检出限为 76.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

3.4 精密度实验

称取 6 份样品, 按 2.2.2 试样制备方法处理样品, 检测样品中的叶酸含量, 计算其 RSD。由表 4 可知, 6 份样品中叶酸的平均含量为: 536.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$, RSD(%)为 3.8%, 表明该方法有较高的精密度, 符合 GB/T 27404-2008^[17]中方法验证的精密度要求(精密度要求: $\text{RSD} \leq 7.5\%$)。

表 4 精密度实验结果
Table 4 Experimental results of precision

序号	1	2	3	4	5	6
X/($\mu\text{g}/100\text{g}$)	561.84	550.21	499.76	543.05	523.62	539.15
平均含量 /($\mu\text{g}/100\text{g}$)	536.3					
RSD/%	3.8					

3.5 重复性实验

另外称取同一批样, 共 6 份, 重新配制叶酸标准溶液, 按 2.2.2 的方法再次测定样品中的叶酸含量, 计算其 RSD。由表 5 结果可知, 重复的结果比较稳定, 6 份样品中叶酸的平均含量为: 536.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$, RSD(%)为 3.4%。与 3.4 的实验数据对比(95%置信度), 采用 F 检验和 t 检验, $F=1.26 < 5.05$, $t=0.02 < 2.23$, 说明 2 组数据无明显差异, 表明方法的重复性良好。

表 7 回收率实验结果
Table 7 Experimental results of recoveries

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
加标水平	50%加标		100%加标			150%加标			
X/($\mu\text{g}/100\text{g}$)	105.93	106.77	102.15	99.53	99.97	95.76	109.64	109.64	95.53
平均回收率/%	102.5								
RSD/%	4.8								

3.6 稳定性实验

称取样品 1.5 g, 重新配制叶酸标准溶液, 按 2.2.2 的方法处理样品并培养 40 h 后, 分别测定其在常温静置 0、2、4、6、8、10 h 后的叶酸含量。由表 6 结果可知, 6 次测定结果中叶酸的平均含量为: 554.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$, RSD(%)为 1.2%, 其 RSD(%)小于 2.0%, 表明该方法有较好的稳定性, 符合含量测定分析方法验证的可接受标准。

表 5 重复性实验结果
Table 5 Experimental results of repeatability

序号	1	2	3	4	5	6
X/($\mu\text{g}/100\text{g}$)	540.00	545.62	552.72	517.01	555.35	508.09
平均含量 /($\mu\text{g}/100\text{g}$)	536.5					
RSD/%	3.4					
差异性	$F < 5.05$, $t < 2.23$					

表 6 稳定性实验结果
Table 6 Experimental results of stability

静置时间	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
X/($\mu\text{g}/100\text{g}$)	557.42	561.22	561.22	544.04	553.29	546.89
平均含量 /($\mu\text{g}/100\text{g}$)	554.0					
RSD/%	1.2					

3.7 回收率实验

精密称取约 1.0 g 样品 9 份(已知样品的叶酸含量为: 536.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$), 分成 3 组, 每组 3 份, 各组分别精密加入叶酸储备液 0.12、0.24、0.36 mL。按 2.2.2 试样制备方法处理样品。由表 7 可知, 该方法加标回收率良好, 不同加标浓度下, 样品加标回收率范围为 99.70%~109.51%, 平均回收率为 102.5%, 相对标准偏差(RSD)为 4.8%, 符合 GB/T 27404-2008^[17]中方法验证的回收率要求(回收率要求: 90%~110%)。

4 结论与讨论

本研究采用微生物法对乳清蛋白粉类样品中的叶酸含量进行测定。叶酸是鼠李糖乳杆菌生长所必需的营养素, 在一定控制条件下, 在叶酸测定培养基中分别加入不等量的叶酸标准工作液和待测样液, 并定量地接种鼠李糖乳杆菌菌液, 培养一段时间后测定吸光度值, 根据测得的标准曲线和样品吸光度值计算样品中的叶酸含量。

由空白实验结果可知, 本研究所用的叶酸测定培养基中含有痕量叶酸, 因此, 实验过程中, 应以培养基空白管调零, 进行培养基中的叶酸扣除实验, 然后再进行标准曲线和样液的紫外吸光度测定。此外, 该实验方法不适用于叶酸含量较低的样品, 培养基中的叶酸本底值会导致样品中的低含量叶酸检测结果不准确。另外, 该实验虽然操作简单, 成本低, 但是菌种的管理、传代和活化过程复杂繁琐, 对实验室和检测人员的能力和素质有较高的要求。

由实验结果可知, 在 0.1010~1.0103 ng/mL 范围内, 叶酸标准曲线线性良好, 所测样品的 RSD 为 3.8%($n=6$), 加标回收实验回收率为 102.5%($n=3$)。表明该含量测定方法准确可靠, 有较高的精密度和良好的重复性和稳定性, 能对乳清蛋白粉类样品中叶酸总含量起到质量控制的目的。

参考文献

- [1] 蒲明清, 戴舒春, 张连龙, 等. 超高效液相色谱法测定保健食品中的多种水溶性维生素[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 886-889.
Pu MQ, Dai SC, Zhang LL, *et al.* Determination of water-soluble vitamins in health food by ultra high performance liquid chromatography [J]. Mod Food Technol, 2012, 28(7): 886-889.
- [2] 谷茜, 刘佳琦, 何达, 等. 神经管缺陷发生原因的循证医学研究[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(24): 3825-3829.
Gu X, Liu JQ, He D, *et al.* Evidence-based medicine research on causes of neural tube defect [J]. Mater Child Health China, 2011, 26(24): 3825-3829.
- [3] 周士胜, 臧益民. B 族维生素过量与心血管病风险[J]. 心脏杂志, 2012, 24(1): 110-113.
Zhou SS, Zang YM. B vitamin overdose and cardiovascular disease risk [J]. Heart Magaz, 2012, 24(1): 110-113.
- [4] 孙春燕, 赵慧春, 欧阳津. 流动注射化学发光法测定叶酸[J]. 分析试验室, 2000, 19(3): 60-62.
Sun CY, Zhao HC, Ou YJ. Determination of folic acid by flow injection chemiluminescence [J]. Chin J Anal Lab, 2000, 19(3): 60-62.
- [5] 蔡建. 超高效液相色谱-串联质谱法测定运动饮料中的叶酸[J]. 食品与发酵工业, 2017, (11): 220-224.
Cai J. Determination of folic acid in sports drinks by ultra-high performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2017, (11): 220-224.
- [6] 冀晔. 超高效液相色谱-串联质谱法测定运动饮品中的叶酸[J]. 食品工业科技, 2017, (24): 274-277.
- [7] Ji Y. Determination of folic acid in sports drinks by ultra-high performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2017, (24): 274-277.
- [7] 黎小兰, 陈彩云, 蔡伟江, 等. 液相色谱-质谱法测定保健食品乳清蛋白粉类中叶酸含量的前处理条件的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 3085-3091.
Li XL, Chen CY, Cai WJ, *et al.* Optimization of pre-treatment conditions for determination of folic acid in whey protein powder of health food by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(8): 3085-3091.
- [8] 田浩, 王志伟, 顾文佳, 等. 微生物法快速测定食品中叶酸含量范围[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 229-232.
Tian H, Wang ZW, Gu WJ, *et al.* Determination of folic acid in food by microbial method [J]. Food Ferment Ind, 2019, 40(1): 229-232.
- [9] 王梦, 张加玲. 荧光法测定果蔬中叶酸含量的研究[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(3): 40-42.
Wang M, Zhang JL. Content determination of folic acid in fruits and vegetables by fluorescence method [J]. Food Nutr China, 2016, 22(3): 40-42.
- [10] 郭秀珠, 黄品湖, 雷海清, 等. 果蔬中叶酸的提取分离及测定方法研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 183-185.
Guo XZ, Huang PH, Lei HQ, *et al.* Study on the extraction purifying and measuring method of the folic acid in fruits and vegetables [J]. Food Sci, 2016, 27(3): 183-185.
- [11] 迟晓星, 张涛, 赵静, 等. 叶酸的提取及抗氧化性研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(10): 1234-1237.
Chi XX, Zhang T, Zhao J, *et al.* Study on extraction conditions and antioxygenic activity of folic acid [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(10): 1234-1237.
- [12] 李江, 严家俊, 綦艳, 等. 酶联免疫法快速检测奶粉中的叶酸[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(10): 37-38.
Li J, Yan JJ, Qi Y, *et al.* Rapid detection of folic acid in milk powder by enzyme-linked immunoassay [J]. China Dairy Ind, 2017, 45(10): 37-38.
- [13] 李贞. ELISA 方法检测牛奶中叶酸含量[J]. 食品研究与开发, 2016, (19): 137-141.
Li Z. Content determination of folic acid by ELISA method [J]. Food Res Dev, 2016, (19): 137-141.
- [14] 唐靓, 李跃中, 陆明扬, 等. 微生物法与 HPLC 测定药品及食品中叶酸含量的比较及应用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(12): 1016-1019.
Tan L, Li YZ, Lu MY, *et al.* Comparison and application of microbial method and HPLC of determination of folic acid in drugs and food [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2009, 26(12): 1016-1019.
- [15] 马景宏, 张旭, 王为黎. 微生物分析法测定保健食品中叶酸[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(6): 576-577.
Ma JH, Zhang X, Wang WL. Determination of folic acid in health food by microbial analysis [J]. Chin J Microecol, 2007, 19(6): 576-577.
- [16] GB 5009.211-2014 食品中叶酸的测定[S].

GB 5009.211-2014 Determination of folic acid in food [S].

[17] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].

GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].



蔡晓霞, 检验员, 主要研究方向为食品质量安全与检测。

E-mail: 1358154204@qq.com

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

“农兽药残留研究与检测”专题征稿函

食用农产品中农药、兽药残留问题是国内外广泛关注的课题。本刊特组织“**农兽药残留研究与检测**”专题, 征集的稿件主要围绕**农兽药残留标准制定与风险评估、农兽药的代谢与迁移转化、农兽药残留样品前处理方法、农兽药残留检测技术与应用、农兽药残留现场检测技术、农兽药残留市场监测与结果分析等**或者**您认为与本专题相关有意义的领域**。该专题计划在 2021 年 1~2 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员和专题主编刘宏程研究员和编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 **2020 年 11 月 30 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题农兽药残留研究与检测):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿选择“**专题: 农兽药残留研究与检测**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: 农兽药残留研究与检测专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部