

离心管微生物法优化食品中的烟酸检测

任新军*, 白祥, 杨凡, 王亚琴, 赵小林

(云南省产品质量监督检验研究院, 昆明 650223)

摘要: **目的** 简化 GB 5009.89—2016 微生物法检测食品中烟酸的步骤和操作, 提高可操作性。**方法** 在国标微生物法的基础上, 将试管改进为一次性离心管, 将移液管改进为微量移液器, 优化校准曲线, 再通过分析校准曲线线性、定量限、精密度和加标回收率验证方法的适用性。**结果** 离心管微生物法根除了试管残留的培养基和试样等造成的污染, 节省准备时间, 配制测定系列管的时间缩短为国标法的 56.8%; 培养体积优化为 2 mL, 称量精密度得到提高; 将烟酸拟合曲线确定为对数曲线方便样品含量的计算, 相关系数 r^2 达到 0.997。离心管法的定量限是 0.17 mg/100 g, 加标回收率是 93.52%~107.95%, 相对标准偏差为 4.60%($n=7$)。实测 16 种不同类型的样品, 烟酸含量在 0.913~5.539 mg/100 g 之间。**结论** 离心管微生物法改善了微生物法的培养体系、缩短了检测周期、操作简便, 适合检测使用。

关键词: 微生物法; 离心管培养; 对数曲线; 烟酸; 食品

Optimization of niacin detection in food by microbiological method cultured in centrifuge tube

REN Xin-Jun*, BAI Xiang, YANG Fan, WANG Ya-Qin, ZHAO Xiao-Lin

(Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming 650223, China)

ABSTRACT: Objective To simplify the steps and operation of microbiological method GB 5009.89—2016 for detecting niacin in food and improving the maneuverability. **Methods** Based on the national microbiological method, the test tube was improved to a disposable centrifuge tube, and the pipette was improved to a micropipette, and the calibration curve was optimized. The applicability of the method was verified by analyzing the linearity of the calibration curve, limit of quantification, precision and recovery of this method. **Results** The microbiological method of centrifuge tube eradicated the pollution caused by the residual culture medium and samples in test tubes, and the method saved the preparation time. The time for preparing determination series tubes was shortened to 56.8% of that in the national standard method. The culture volume was optimized to be 2 mL, and the weighing precision was improved. The fitting curve of niacin was determined as the logarithmic curve to facilitate the calculation of the sample content, and the correlation coefficient r^2 reached 0.997. The limit of quantitation for the centrifuge tube method was 0.17 mg/100 g, and the recoveries were 93.52%–107.95% with a relative standard deviation of 4.60% ($n=7$). The content of niacin in 16 different types of samples was measured to be within the range of 0.913–5.539 mg/100 g. **Conclusion** Microbiological method of centrifugal tube improves the culture system of

基金项目: 云南省科技创新平台建设计划(2015DH022)

Fund: Supported by the Construction Plan of Yunnan Science and Technology Innovation Platform (2015DH022)

*通信作者: 任新军, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: renxinjun333@sina.com

*Corresponding author: REN Xin-Jun, Ph.D, Senior Engineer, Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming 650223, China. E-mail: renxinjun333@sina.com

microbiological method which shortens the detection period. The method is easy to operate and suitable for detection.

KEY WORDS: microbiological method; culture in centrifuge tube; logarithmic curve; niacin; food

0 引言

烟酸又名维生素 B₃, 与糖酵解、脂肪代谢、组织呼吸等人体代谢具有密切关系, 在维持皮肤和消化器官正常功能中起着重要作用^[1-2]。微生物法测定维生素的方法性研究, 主要集中在试剂盒与国标法的比较, 应用于婴幼儿食品和乳品的检测^[3-4]。国标微生物法具有成本低、可操作性强、灵敏度高等优点, 对于含量低于仪器检出限的维生素, 需要微生物法进行测定^[5]。但是, 国标微生物法操作复杂, 实验周期长, 步骤烦琐, 误差较大, 结果重复性差^[5], 在实际应用过程中不确定因素较多, 工作量大, 不易掌握^[6], 需要适当地简化步骤、改进操作。对国标微生物法的改进已经取得了如下进展: -20 °C 冷冻的菌种延长了接种菌保藏时间^[7], -80 °C 冻存接种液省去了接种菌制备过程^[8], 菌种活化步骤得到优化^[9], 小管配制标准溶液改进了叶酸标准曲线^[10], 快速检测方法估算了叶酸含量的上下限范围^[11], 细菌生长动力学模拟修正了生长曲线的位移^[12]。近年对烟酸检测方法的研究仅验证了微生物法的重复性和准确度^[13]、比较高效液相色谱法与微生物法的异同^[14]、评估烟酸测定的最优线性范围^[15], 对烟酸检测方法研究偏少。

本研究在国标微生物法的基础上, 借鉴分子生物学方法, 以烟酸为例改进培养体系, 优化试管为一次性离心管, 优化移液管为微量移液器, 并参照方法确认标准^[16]的要求确认方法指标, 以期简化食品中烟酸测定的操作步骤, 提高操作速度。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 材料与试剂

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)(CICC 6076, 中国工业微生物菌种保藏管理中心); 乳酸杆菌琼脂培养基(HB8636)、乳酸杆菌肉汤培养基(HB8637-2)(海博生物技术有限公司); 烟酸测定用培养基(CM1404, 北京陆桥技术有限公司); 烟酸标准品[编号 GBW(E)100184, 纯度 99.9%, 中国计量科学研究院]; 婴儿配方乳粉质控样品(证书编号 803IP10052, 中国检验检疫科学研究院测试评价中心); 离心管(5 mL, 北京兰杰柯科技有限公司); 食用淀粉(200 g, 成都达恒毛实业有限公司)。

1.1.2 实验仪器

Tissue Homogenizer 均质器(美国 OMNI 公司); PYH-DHS-60X75-BS-II 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); SN510C 立式压力蒸汽灭菌器(重庆雅马拓科

技术有限公司); CT15RE 型台式高速离心机(日立工机有限公司); PHS-3E 酸度计(上海仪电科学仪器有限公司); UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津仪器公司); SW-CJ-1FD 超净工作台(苏净集团安泰公司); 移液器(100~1000 μL、20~200 μL、2~20 μL, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 基础方法

以 GB 5009.89—2016《食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定》^[17]国标方法为基础方法。烟酸检测试剂的配制、标准工作液的配制、接种菌的制备、试样制备、稀释、培养方法、测定和结果计算等按照国标方法进行。

1.2.2 离心管法培养与国标法培养的比较

分别采用 25 mL 试管加 5 mL 水、5 mL 乳酸杆菌肉汤培养基、50 μL 植物乳杆菌接种液; 5 mL 离心管加 1 mL 水、1 mL 乳酸杆菌肉汤培养基、10 μL 植物乳杆菌接种液, 采用相同的水、标准溶液、培养基和接种液, 各 11 次重复, (36±1)°C 同时培养 20 h。灭菌时将离心管放在相应孔径的离心管盒内, 垫上棉纸, 盖上离心管盒的盖子。

1.2.3 移液管和移液器加样速度和加样精密度的比较

采用国标微生物法最常用的 5 mL 移液管与离心管法最常用的 1 mL 移液器比较。在样品检测过程中配制 30 只标准系列管, 3 次重复, 分别记录加入水、标准溶液和培养基的时间。

5 mL 移液管和 1 mL 移液器, 分别在 3 台电子天平上各称取超纯水 11 次, 计算相对标准偏差。

1.2.4 定量限

采用空白标准偏差法评估, 即加入最低可接受的样品空白独立测试 10 次^[16]。取 2.5 g 食用淀粉, 加 50 mL 一级水, 用稀盐酸调节 pH 至 4.5, 反复摇匀, 静置 4 h 以上, 弃上清, 然后按 GB 5009.89—2016^[17]方法处理。稀释 20 倍作为样品空白, 设置 10 次重复。按 10 倍标准偏差计算定量限。

1.2.5 精密度和回收率

准确称取乳粉质控样品 1.00 g, 按照 GB 5009.89—2016^[17]处理, 用离心管法 7 次重复测定, 计算相对标准偏差。准确取质控样品 1.00 g, 加入 260 μL 烟酸标准储备液(0.1 mg/mL), 7 次重复。对应扣减试样空白, 计算加标回收率。样品检测时质控乳粉参与了多批次的检测, 统计相近 6 次的结果作为实验室内重复数据。

1.3 统计分析

运用 Excel 2007 软件对数据进行整理, 对 3 次重复的数据用 IBM SPSS Statistics 23.0 统计软件采用单因素

方差分析检验各组之间是否存在差异,采用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 培养容器和称量量具优化

离心管法与 GB 5009.89—2016^[17]相比,离心管可以在控制成本的基础上采用一次性耗材,根除试管壁上培养基、试样及试剂残留造成的污染。同时,省去测定系列管制备过程,不再进行试管洗涮、水煮、盐酸浸泡、烘干等步骤,节省了直接制备时间。

由试管改为离心管,主要是培养体积和盖盖方式的变化,可以通过培养结果进行比较。试管培养和离心管培养的吸光度分别是 1.699 ± 0.020 和 1.693 ± 0.017 , $P=0.469$ ($n=11$),从培养效果看,二者几乎没有差别。

试管法配制标准系列管加水、标准溶液和培养基的时间分别需要 7.51 ± 0.34 、 7.71 ± 0.28 、 7.24 ± 0.27 min,合计 22.46 min,离心管法分别需要 4.29 ± 0.21 、 4.34 ± 0.13 、 4.13 ± 0.10 min,合计 12.76 min,离心管法配制标准系列管需要的时间是试管法的 56.8%。其他需要使用移液管或

移液器的环节情况类似。离心管法使用移液器节省了操作时间。

移液管取样的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)是 0.245%~0.443%,平均值是 0.380%;移液器取样的 RSD 是 0.096%~0.207%($n=11$),平均值是 0.184%。移液器取样精密度较好,二者具有显著差别($P<0.05$)。

2.2 培养体系优化

采用 5 mL 一次性柱形离心管,优化培养体积为 2 mL,整个测定系列管配制过程可以用 1 mL 移液器完成。2 mL 体积适合分光光度计常量测定,没有剩余培养液。烟酸标准工作液的质量浓度和 GB5009.89—2016^[17]一样为 100 ng/mL,只是总体积和各加入量的体积是国标法的 20%,对应各管浓度与国标法相同。培养体积的减少还节约了测定培养基和试剂。表 1 是优化后的烟酸标准曲线系列管配制方法,浓度梯度是 10~100 ng/mL,配好后各加入 1000 μ L 按包装说明配制的测定培养基。表 2 是 4 个浓度梯度的试样系列管制作,与标准曲线系列管同时制备。

表 1 烟酸校准曲线管的制作
Table 1 Fabrication of niacin calibration curve tube

管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
蒸馏水/ μ L	1000	1000	900	800	600	400	200	0
标准工作液/ μ L	0	0	100	200	400	600	800	1000
质量浓度/(ng/mL)	0	0	10	20	40	60	80	100
培养基/ μ L	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

表 2 试样系列管的制作(μ L)
Table 2 Preparation of sample series tubes(μ L)

离心管号	1	2	3	4
蒸馏水	800	600	400	200
样品稀释液	200	400	600	800
培养基	1000	1000	1000	1000

2.3 烟酸校准曲线优化

离心管微生物法使用质量浓度取代国标法中的含量^[17],制作对数曲线,相关系数 r^2 为 0.997,满足校准曲线对相关系数 r^2 的要求^[16]。对数曲线方便采用反对数公式计算样品含量,简便实用。校准曲线公式中 X 轴由 x 形式优化为 $x+c$ 形式(c 为常数),可以提高相关性。由国标法使用的含量优化为质量浓度作图,具有更好的适用性。图 1 是优化后的烟酸校准曲线。

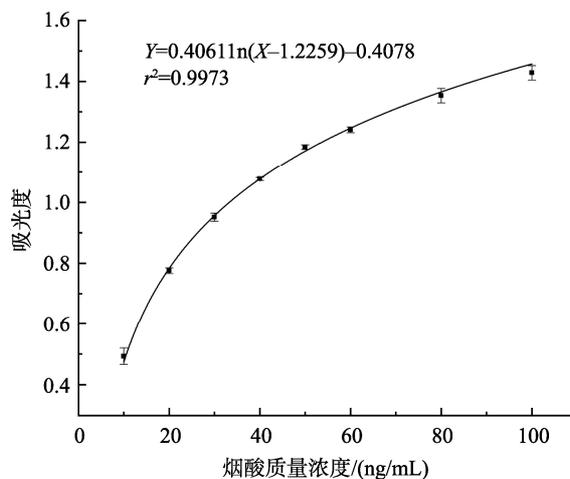


图 1 离心管微生物法烟酸对数曲线
Fig.1 Niacin logarithmic curve by microbiological method of centrifuge tube

2.4 方法的线性范围和定量限

离心管法测定烟酸含量在标准点 10~100 ng/mL 范围内,符合对数规律;在较低浓度 0.05~10 ng/mL 范围内,符合直线规律,如图 1 和图 2。2 种校准曲线在各自的线性范围内都有很好的相关性,相关系数 0.997 以上,满足校准曲线对相关系数 r^2 的要求^[16]。离心管法的相关系数 r^2 优于国标法^[15]。

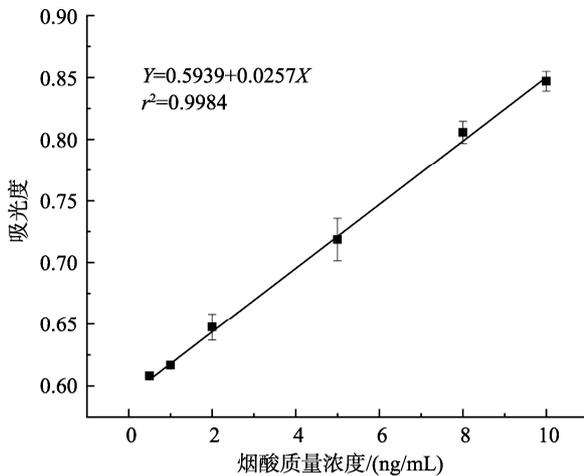


图 2 低浓度烟酸标准曲线

Fig.2 Standard curve in low concentration of niacin

离心管法的定量限在低浓度校准曲线的直线范围内测定。以 20 倍样品稀释液 10 次重复测定,食用淀粉稀释液测定结果分别是 1.835、2.011、1.794、1.911、2.339、2.225、2.144、2.339、2.300 和 1.911 ng/mL,计算出 2.5 g 食用淀粉稀释 20 倍时的定量限为 0.17 mg/100 g。

2.5 精密度和回收率

7 次平行测定结果平均值为 5.228 mg/100 g,标准偏差为 0.2403 mg/100 g, RSD 为 4.60%($n=7$)。取 6 次不同批次的结果统计,实验室内平均值为 5.827 mg/100 g,标准偏差为 0.964 mg/100 g, RSD 为 16.53%($n=6$)。显示了微生物法平行实验重复性好、实验室内重复性差的特点^[5]。7 次加标回收率测定结果在 93.52%~107.95%之间,平均值是 100.70%,结果见表 3。

2.6 实际样品测定

通过对 16 种食品进行检测,结果表明,植物性食品烟酸含量较低,一般小于 1.5 mg/100 g。金菊中未检出烟酸,可能是烟酸含量低,也可能是样品中含有抑菌物质。肉类食品中烟酸含量在 1.684~5.539 mg/100 g 之间;奶粉中烟酸含量在 3.242~4.537 mg/100 g 之间;功能饮料为 4.914 mg/100 g,结果见表 4。离心管法在实测中能够较快速、准确地检测,操作失误较少。

表 3 烟酸重复性实验和加标回收实验

Table 3 Repetitive experiment and recovery experiment of niacin

平行样品	检测值/(mg/100 g)	加标重复	加标检测值/(mg/100 g)	回收率/%	实验室内重复	检测值/(mg/100 g)
1	5.048	a	7.756	97.21	01	6.439
2	4.855	b	7.660	93.52	02	7.175
3	5.377	c	7.921	103.56	03	4.609
4	5.604	d	8.035	107.95	04	6.505
5	5.182	e	7.823	99.79	05	5.583
6	5.322	f	7.894	102.52	06	4.654
7	5.211	g	7.838	100.37		

表 4 食品中烟酸含量测定

Table 4 Determination of niacin content in food

样品	取样量/g	稀释倍数	实测含量/(mg/100 g)
红果参嫩尖	3.070	4	1.095±0.022
食用玫瑰	0.726	1	0.913±0.025
葛根干片	0.321	1	1.438±0.046
澳洲坚果	1.086	4	1.360±0.032
金菊	0.618	1	未检出*
鹅肉	0.725	2	1.684±0.024
火腿	0.810	5	3.905±0.044

表 4(续)

样品	取样量/g	稀释倍数	实测含量/(mg/100 g)
鸡肉	0.709	5	4.750±0.020
猪肉	0.800	5	2.516±0.218
牛干巴	0.803	5	5.066±0.067
阉鸡肉	0.810	5	5.539±0.037
独龙牛肉	0.804	4	4.328±0.016
儿童羊奶粉	1.020	4	3.242±0.011
孕妇羊奶粉	0.996	8	4.537±0.036
配方奶粉	2.007	10	3.269±0.047
功能饮料	0.994	10	4.914±0.283

注: *检出限为 0.05 mg/100 g。

3 结 论

离心管微生物法采用一次性离心管,能够根除试管壁上残留的培养基、试样及试剂造成的污染,省去测定系列管制备过程,在培养效果上与GB 5009.89—2016没有差别。离心管法配制标准系列管需要的时间是国标法的56.8%,取样精密度相应提高。2 mL的培养体积同时适合移液器操作和分光光度计常量测定,优化的体积节约了测定培养基和试剂。离心管法在测量范围内对数曲线的相关系数 r^2 达到0.997,方便采用反对数公式计算样品含量。离心管法的定量限为0.17 mg/100 g,加标回收率为93.52%~107.95%,相对标准偏差为4.60%($n=7$)。经过对16种食品的实测,离心管法能够较快速、准确地检测。离心管法改善了国标微生物法的培养体系,缩短了检测周期,操作简便,可以在多种维生素的检测中使用。同时,一次性离心管会产生一些废旧塑料垃圾,建议塑料回收。

参考文献

- [1] MORESCHI ECP, MATOS JR, ALMEIDA-MURADIAN LB. Thermal analysis of vitamin PP niacin and niacinamide [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2009, 98(1): 161–164.
- [2] BOGAN KB, BRENNER C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: A molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition [J]. *Annu Rev Nutr*, 2008, (28): 115–130.
- [3] 崔国萍, 黄宝钗, 杨薇. 微生物法与试剂盒法测定婴幼儿配方奶粉中叶酸含量的方法比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(13): 3497–3500.
CUI GP, HUANG BC, YANG W. Comparison of the determination of folic acid content in infant formula powders by microbiological method and the kit method [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(13): 3497–3500.
- [4] 程敏, 刘锦光. 传统微生物法与试剂盒法测定奶粉中生物素比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(4): 988–991.
CHENG M, LIU JG. Comparison for determination of biotin in milk powder by microbiological method and kit method [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(4): 988–991.
- [5] 王博伦, 顾丰颖, 刘子毅, 等. 食品中叶酸测定方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 294–300.
WANG BL, GU FY, LIU ZY, *et al.* Advances in methods for the determination of folate in foods [J]. *Food Sci*, 2020, 41(9): 294–300.
- [6] 祖新, 李潇玲, 焦成瑾. 维生素 B₁₂ 检测方法研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(17): 200–206.
ZU X, LI XL, JIAO CJ. Research progress in detection of vitamin B₁₂ [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(17): 200–206.
- [7] 李全霞, 崔亚娟, 陈兆天, 等. 利用冷冻保藏菌种测定食品中的水溶性维生素[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 59–63.
LI QX, CUI YJ, CHEN ZT, *et al.* Use of cryopreserved cultures for microbiological assay of soluble-vitamins in food [J]. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(1): 59–63.
- [8] 黄进丽, 杨祖伟, 陈叶兰, 等. 微生物法检测叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 接种液制备方法的优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(1):

99–105.

HUANG JL, YANG ZW, CHEN YL, *et al.* Optimization of preparation method of inoculating solution for microbial detection of folic acid, biotin and vitamin B₁₂ [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(1): 99–105.

- [9] 陈靖欣, 梁梅娟, 苏佩冰, 等. 微生物法检测婴幼儿奶粉中游离生物素方法研究[J]. *现代农业科技*, 2019, (15): 224–225.
CHEN JX, LIANG MJ, SU PB, *et al.* Research on microbiology detection method for free biotin in infant milk powder [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2019, (15): 224–225.
- [10] 罗敏婷, 吴克刚, 黄伟乾. 婴幼儿辅食营养补充品中叶酸的测定方法[J]. *食品与机械*, 2016, 32(9): 34–38.
LUO MT, WU KG, HUANG WQ. Methods of detecting the content of folic acid in infant complementary food supplements [J]. *Food Mach*, 2016, 32(9): 34–38.
- [11] 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): 229–233.
TIAN H, WANG ZW, GU WJ, *et al.* Rapid determination of folic acid content range in food by microbiological method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(1): 229–233.
- [12] KOBANY S, SCHMIEG D, PLANK DW, *et al.* Determination of total folates in complex nutritional drinks and supplements using a tri-enzyme microbiological method and michaelis-menten kinetics [J]. *J AOAC Int*, 2019, 102(3): 971–974.
- [13] 殷晓红, 杨金宝, 刘波, 等. 微生物法测定食品中的烟酸和烟酰胺[J]. *中国乳品工业*, 2003, (2): 32–35.
YIN XH, YANG JB, LIU B, *et al.* Determination method for niacin in infants formula food [J]. *China Dairy Ind*, 2003, (2): 32–35.
- [14] 袁硕. 高效液相色谱法与微生物法测定食品中烟酸的比较[J]. *生物技术*, 1999, (2): 39–41.
YUAN S. Comparison of determination of niacin in food by HPLC and microbiological method [J]. *Biotechnology*, 1999, (2): 39–41.
- [15] 顾晨荣, 徐琼, 庞贝妮, 等. 微生物法测定婴幼儿乳粉中烟酸含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(5): 1143–1146.
GU CR, XU Q, PANG BN, *et al.* Determination of niacin in infant milk powder by microbiological method [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(5): 1143–1146.
- [16] RB/T 033—2020 微生物检测方法确认与验证指南[S].
RB/T 033—2020 Guidance on verification and validation of microbiological testing methods [S].
- [17] GB 5009.89—2016 食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定[S].
GB 5009.89-2016 National food safety standards-Determination of niacin and niacin amide in food [S].

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



任新军, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验。

E-mail: renxinjun333@sina.com