

微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中泛酸含量

赵平, 郭莹莹, 王玉芝, 丁松桥, 李兴霖, 宋连宝, 杨光*

(黑龙江省质量监督检测研究院, 哈尔滨 150028)

摘要: **目的** 采用微孔板式微生物法对婴幼儿配方乳粉中泛酸含量进行测定。**方法** 采用微孔板法将合适浓度的植物乳杆菌液接种至含有试样液与培养液的无菌微孔板中, 培养一定时间后测定吸光度值, 根据泛酸含量与吸光度值的标准曲线计算出试样中泛酸的含量。通过精密度实验、准确度实验、加标回收实验对此方法进行评价。**结果** 微孔板式微生物法的标准曲线线性良好, 相关系数 $r=0.9965$, 精密度的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 1.90%~5.32%。实验结果表明质控样品的泛酸含量各平行检测值均在定量值范围内, 且平均值为 6.91 mg/100 g, 测定值结果间 RSD 为 1.08%, 回收率为 89.7%~108.2%。**结论** 该方法操作简便、结果准确, 能够降低工作量, 提高工作效率, 且方法精密度较高, 对样品检测结果准确性较高, 方法系统误差小, 能够应用于实验室对婴幼儿配方乳粉中泛酸含量的测定。

关键词: 微孔板; 泛酸; 含量测定; 方法评价

Determination of pantothenic acid content in infant formula milk powder by microplate microbial method

ZHAO Ping, GUO Ying-Ying, WANG Yu-Zhi, DING Song-Qiao, LI Xing-Lin, SONG Lian-Bao, YANG Guang*

(Quality Supervision and Testing Institute of Heilongjiang Province, Harbin 150028, China)

ABSTRACT: Objective To determine the pantothenic acid content in the infant formula milk powder by a microplate microbial method. **Methods** The *Lactobacillus plantarum* solution with appropriate concentration was inoculated into a sterile microplate containing the sample solution and the culture solution by using a microplate method, the absorbance value after culture for a certain time was measured, and the content of pantothenic acid in the sample was calculated according to the standard curve of the pantothenic acid content and the absorbance value. The method through precision experiment, accuracy experiment and standard addition recovery experiment was evaluated. **Results** The linearity of the standard curve of the microplate microbial method was good, with the correlation coefficient $r=0.9965$, and the relative standard deviation (RSD) of the precision experiment was 1.90%~5.32%. The experimental results showed that the parallel detection values of pantothenic acid content in quality control samples were within the quantitative value range, and the average value was 6.91 mg/100 g; the RSD between the

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项项目(2020YJ010)

Fund: Supported by the Special Project of Technical Support of State General Administration of Market Supervision and Administration (2020YJ010)

*通信作者: 杨光, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全、微生物检测与研究。E-mail: 41921995@qq.com

*Corresponding author: YANG Guang, Master, Senior Engineer, Quality Supervision and Testing Institute of Heilongjiang Province, No.1218, Chuang Xiner Road, Songbei District, Harbin 150028, China. E-mail: 41921995@qq.com

determination results was 1.08%; the recovery rate was 89.7%–108.2%. **Conclusion** This method is simple, accurate, can reduce the workload and improve the efficiency, and the method has high precision, high accuracy of sample test results. The method system error is small. It can be applied to the laboratory to determine the content of pantothenic acid in infant formula milk powder.

KEY WORDS: microplate; pantothenic acid; content determination; method evaluation

0 引言

婴幼儿对食品营养的要求较高,为了满足需求,需强化营养。但婴幼儿较敏感,过高或过低的营养强化物质会影响其身体健康,添加量必须限定在婴幼儿能够适应的范围内。泛酸是人体维持正常生理功能所必需的营养物质,是辅酶 A 和酰基载体蛋白的必需前体^[1-3],是婴幼儿乳粉中添加的重要营养强化剂^[4-5],GB 10765—2010《食品安全国家标准 婴儿配方食品》与 GB 10767—2010《食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品》中对泛酸加入的量都有严格的规定,故应重视对婴幼儿配方乳粉中营养强化物质含量的检测以对食品质量进行监控^[6-8]。

泛酸作为婴幼儿配方乳粉中的重要营养强化剂,其含量的测定方法主要是微生物法与液相色谱法。液相色谱法因灵敏度低、无法检测结合态的泛酸,国标微生物法因灵敏度高^[9-10],且可检测样品中总泛酸含量,故目前主要应用微生物法测定婴幼儿配方乳粉中泛酸含量^[11-12]。微生物法是微生物生长利用泛酸,将检测体系中微生物总量或代谢产物总量作为被测样品中泛酸的含量。但微生物法开展起来对人员要求高、操作步骤烦琐、工作量大、效率低下、检测时间长^[13-15],不能大批量快速检测^[16-18]。

相比于传统的微生物法,实验室所用的在国标微生物法的基础上改进的微孔板式微生物法是对国标微生物法进行了优化,其检测原理与国标微生物法相同,依然遵循国标法,但微孔板式微生物法更加容易操作,能够降低工作量减少成本、缩短检测时间、提高工作效率。与试剂盒相比,实验室所用微孔板式微生物法的检测成本较低,且能够达到与试剂盒等效的目的,能够在实验室中稳定地开展。本研究针对实验室中大量的检测任务在应用国标微生物法时,因操作烦琐、工作量大、而国标中又不允许应用试剂盒、且试剂盒检测成本较高等原因,开展了能够降低检测成本与减少工作量、提高工作效率的微孔板式微生物法的研究,并通过精密度实验、准确度实验、加标回收实验对此方法的可行性进行评价,为实验室应用微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中泛酸含量提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

SQP 精密天平(德国 Sartorius 公司); KQ5200DE 超声

仪(昆山市超声仪器有限公司); PB-10 pH 计(德国赛多利斯公司); T6 新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 2266 洁净工作台(上海拜艾斯净化设备有限公司); MX-S 涡旋振荡器(美国 SCILOGEX 公司); HPS-400 生化培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); PHOMO 酶标仪(郑州安图生物股份有限公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 材料与试剂

SRM 1849a 质控样品(含量范围 6.82±0.19 mg/100 g, 美国国家标准技术研究院); 不同品牌的 5 种市售婴幼儿配方乳粉(超市及孕婴店); Millex-GP 一次性无菌滤器(美国 Millipore 公司)。

植物乳杆菌 ATCC 8014(美国 Microbiologics 公司); 泛酸钙标准品(99.0%, 北京曼哈格生物科技有限公司); 乳酸杆菌琼脂、乳酸杆菌肉汤、泛酸测定培养基(美国 BD 公司); 无水乙醇(分析纯, 天津市天力化学试剂有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 测试菌液的制备

将植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)ATCC 8014 接种至乳酸杆菌肉汤中, 37 °C 培养 24 h。再将培养物转接至乳酸杆菌琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 作为贮备菌种。将贮备菌种接种至乳酸杆菌肉汤, 37 °C 培养 24 h, 在无菌条件下离心, 弃上清液。用生理盐水振荡洗涤菌体, 离心, 弃去上清液, 再用生理盐水振荡清洗, 重复操作。再加生理盐水, 混匀, 制成测试菌液。制备好的测试菌液用紫外分光光度计调节透光率至 30%~35% 备用。

1.3.2 样品处理方法

参照 GB 5009.210—2016《食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》中第一法微生物法进行样品处理。根据样品泛酸含量标识计算样品称取量, 称取 1.00 g 样品加入 80 mL 20%乙醇溶液, 超声提取 4 h 用去离子水定容至 100 mL, 用 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 根据样品泛酸含量标识将其稀释至合适浓度。

1.3.3 培养基的制备

泛酸测定培养基按培养基制备说明配制, 煮沸完全溶解后冷却, 将冷却好的培养基用 0.22 μm 无菌滤膜过滤后备用。

1.3.4 标准曲线的绘制

参照 GB 5009.210—2016 中第一法微生物法标准曲线

设置标准曲线系列浓度。吸取泛酸标准中间液(1.00 μg/mL)4 mL至10 mL无菌离心管中,加入2 mL无菌水混匀作为泛酸标准工作液。按表1系列浓度进行稀释制备标准曲线工作液。以各标准点吸光度为横坐标,系列浓度泛酸含量为纵坐标绘制标准曲线。

表 1 标准曲线系列浓度
Table 1 Concentration of standard curve series

泛酸含量/ng	泛酸标准工作液/μL	无菌水/μL
0	0	1000
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400
70	700	300
80	800	200
90	900	100
100	1000	0

1.3.5 培养、测定与计算

用8联排微量移液器在微孔板的每个微孔中加入5 μL制备好的植物乳杆菌(ATCC 8014)测试菌液,再用8联排微量移液器移取150 μL已制备泛酸测定培养基于微孔中,然后用微量移液器移取150 μL系列浓度的标准曲线工作液与适当稀释的样品溶液于指定的微孔中,加液完毕后,用微孔板封口膜封好微孔板,置生化培养箱37℃黑暗环境中培养22~26 h。培养后将微孔板充分震荡混匀,揭开微孔板封口膜,用移液器枪头去除微孔中表面气泡,然后利用酶标仪在550 nm波长下读取各微孔的吸光度。以吸光度为横坐标、泛酸含量为纵坐标绘制标准曲线,参照GB 5009.210—2016中第一法微生物法的计算方法计算样品泛酸含量结果。

1.3.6 精密度实验

方法精密度是在相同实验条件下分析多次重复测定结果的符合程度,以相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示,RSD值越小,方法越精密^[19]。本研究采用实验室微孔板式微生物法对5种不同品牌的市售婴幼儿配方乳粉中泛酸含量进行测定,每个样品进行7次平行测定,计算测定结果及平均值与相对标准偏差。

1.3.7 准确度实验

方法准确度是测定值与定量值的标准物质控样品定

量值间的符合程度^[19]。实验采用实验室微孔板式微生物法对质控样品进行泛酸含量的测定,进行7次平行测定,计算测定结果及平均值与相对标准偏差。

1.3.8 加标回收实验

加标回收实验是分析结果准确度的重要质控手段,回收率是检验结果准确度的量化指标^[19-20]。实验参照GB 5009.21—2016中第一法微生物法,将配制好的1.00 μg/mL泛酸标准中间液作为加标液。称取4份1.00 g同一婴幼儿配方乳粉样品,对其中3份样品进行三水平加标,分别加入5、10、15 mL泛酸标准中间液。用此微孔板式微生物法对本样品和三水平加标样品进行7次平行泛酸含量测定,并计算不同泛酸加标量的检测结果的平均值与回收率。

回收率计算公式为回收率(%)=(泛酸加标样品测定含量值-样品泛酸含量本底测定值)/泛酸加标含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制

微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中泛酸含量实验的标准曲线线性范围为10~100 ng,线性方程为 $Y=20.95X^2+106.1X-44.62$,相关系数 $r^2=0.9965$,线性良好。同时此微孔板微生物法与国标微生物法线性范围一致,定量限与国标微生物法相同,能够满足国标微生物法的要求。此微孔板法适合应用于实验室中婴幼儿配方乳粉中泛酸含量的测定。标准曲线如图1所示。

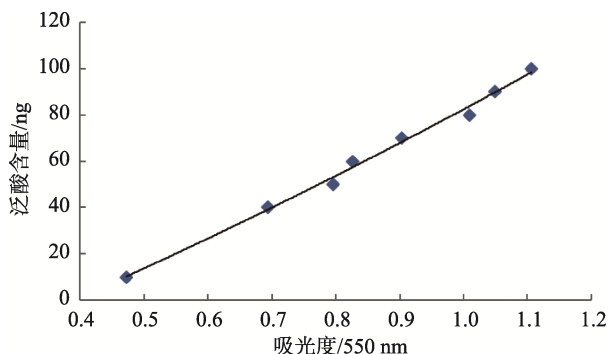


图 1 标准曲线

Fig.1 Standard curve

2.2 精密度实验

精密度实验主要是用来分析检测结果之间的一致性,通常以相对标准偏差来分析,RSD值越小说明方法性重现性越好、越稳定。精密度实验结果见表2,由表2可知,采用实验室微孔板式微生物法检测的5个样品中的泛酸含量,7个平行的RSD为1.90%~5.32%,说明实验室微孔板式微生物法的精密度较好,方法稳定,且结果重现性好。

2.3 准确度实验

准确度实验结果见表 3。由表 3 可见质控样品平行测定值均在定量值范围内, 平均值为 6.91 mg/100 g, 测定值结果间 RSD 为 1.08%, 说明实验室微孔板式微生物法对质控样品中泛酸含量检测结果较一致, 检测结果准确性较高, 能够满足实验室在婴幼儿配方乳粉中泛酸含量测定的应用。

2.4 加标回收实验

加标回收实验结果见表 4。由表 4 结果可见, 按微孔板式微生物法进行的三水平加标回收实验, 检测的结果为

本底样品加入 5 μg 的回收实验的回收率为 80.0%~98.0%, 平均回收率为 89.7%, RSD 为 7.77%, 但离散变化较大, 可能是由于加标量小等原因所导致。本底样品加入 10 μg 的回收实验的回收率为 98.0%~106.0%, 平均回收率为 103.1%, RSD 为 2.71%。本底样品加入 15 μg 的回收实验的回收率为 104.0%~112.7%, 平均回收率为 108.2%, RSD 为 2.70%。从实验结果可以得出实验室微孔板式微生物法的三水平加标回收实验平均回收率为 89.7%~108.2%, 方法在选择合适的加标水平情况下回收率能够接近 100%, 说明该方法的系统误差小, 准确度较高。

表 2 精密度实验结果
Table 2 Results of precision experiment

样品	检测结果/(mg/100 g)							平均值/(mg/100 g)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7		
1	4.73	4.12	4.25	4.29	4.46	4.33	4.72	4.41	5.32
2	6.12	5.84	6.15	6.04	5.98	6.02	6.17	6.05	1.90
3	3.65	3.60	3.84	3.69	3.75	3.67	3.76	3.71	2.17
4	5.66	5.30	5.56	5.46	5.53	5.59	5.62	5.53	2.18
5	7.65	7.56	7.36	7.56	7.33	7.26	7.30	7.43	2.08

表 3 准确度实验结果
Table 3 Results of accuracy experiment

定量值/(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)							均值/(mg/100 g)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7		
6.82±0.19	6.89	6.94	7.00	6.99	6.84	6.80	6.93	6.91	1.08

表 4 加标回收实验结果
Table 4 Experimental results of spiked recovery

样品本底值/(mg/100 g)	添加量/(mg/100 g)	实测值/(mg/100 g)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
3.71	0.5	4.19	96.0	89.7	7.77
		4.20	98.0		
		4.18	94.0		
		4.13	84.0		
		4.11	80.0		
	1.0	4.13	84.0		
		4.17	92.0		
		4.72	101.0		
		4.77	106.0		
		4.76	105.0		
1.0	4.69	98.0	103.1	2.71	
	4.74	103.0			
	4.76	105.0			
	4.75	104.0			

表4(续)

样品本底值/(mg/100 g)	添加量/(mg/100 g)	实测值/(mg/100 g)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
		5.33	108.0		
		5.36	110.0		
		5.27	104.0		
3.71	1.5	5.31	106.7	108.2	2.70
		5.40	112.7		
		5.36	110.0		
		5.3	106.0		

3 结论与讨论

本研究应用实验室在国标微生物法的基础上改进的微孔板式微生物法,对质控样品和5种婴幼儿配方乳粉样品中泛酸含量进行检测,通过精密度实验、准确度实验、加标回收实验对方法的可行性进行了评价。精密度实验采用实验室微生物微孔板法检测的5个样品中的泛酸含量,结果RSD为1.90%~5.32%,说明方法精密度较高;准确度实验结果表明,质控样品的泛酸含量各平行检测值均在定量值范围内,且平均值为6.91 mg/100 g, RSD为1.08%,方法对质控样品检测结果准确性较高;加标回收实验结果为89.7%~108.2%,表明该方法的系统误差小。方法评价实验结果表明实验方法系统误差小、准确度高、精密度高,能够满足实验室对婴幼儿配方乳粉中泛酸检测项目的要求。

与国标微生物法相比,本研究在国标微生物法的基础上改进的微孔板式微生物法操作简便、省时,在一定程度上能够减少培养基等消耗品的使用,降低成本、减少工作量、提高工作效率,且相比于检测试剂盒更加接近国标微生物法而不偏离国标微生物法,而检测试剂盒价格较昂贵又与国标微生物法在样品处理与培养测定上有所不同偏离国标微生物法。综合以上评价,本研究在国标微生物法基础上改进的微孔板式微生物法能够应用于婴幼儿配方乳粉中泛酸含量的测定中。

参考文献

- [1] XU JS, PATASSINI S, BEGLEY P, *et al.* Cerebral deficiency of vitamin B₅ (d-pantothenic acid; pantothenate) as a potentially-reversible cause of neurodegeneration and dementia in sporadic Alzheimer's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(3): 676-681.
- [2] COMBS JRGF, MCCLUNG JP. Chapter 16-pantothenic acid, the vitamins (fifth edition) [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2017.
- [3] 李兴霖, 杨光, 赵平, 等. 微生物法测定婴幼儿配方乳粉中的泛酸含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(6): 2257-2262.
LI XL, YANG G, ZHAO P, *et al.* Determination of pantothenic acid in infant formula milk powder by microbial method [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(6): 2257-2262.
- [4] 刘琳, 刘岩, 段小娟, 等. 高效液相色谱法测定乳及乳制品中泛酸分析方法的改进[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(11): 4190-4194.
LIU L, LIU Y, DUAN XJ, *et al.* Optimization the method for determination of pantothenic acid in milk and dairy product by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(11): 4190-4194.
- [5] 赵平, 郭莹莹, 王玉芝, 等. 不同国标法对婴幼儿配方乳粉中泛酸含量的测定[J]. *现代食品*, 2021, 62(2): 219-222.
ZHAO P, GUO YY, WANG YZ, *et al.* Determination of pantothenic acid in infant formula milk powder by different national standards [J]. *Mod Food*, 2021, 62(2): 219-222.
- [6] 姜晔, 唐成康. 泛酸研究及其应用[J]. *四川食品与发酵*, 2004, 40(120): 11-13.
JIANG H, TANG CK. Research and application of pantothenic acid [J]. *Sichuan Food Ferment*, 2004, 40(120): 11-13.
- [7] 屈雅莉, 尹亚新, 左丽娜, 等. 不同基质奶粉中泛酸检测方法对比[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(23): 8753-8761.
QU YL, YIN YX, ZUO LN, *et al.* Comparison of detection methods of pantothenic acid in different matrix milk powder [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(23): 8753-8761.
- [8] 涂晓波, 王舒乐, 黄欣迪, 等. 2种微孔板试剂盒测定奶粉中3种水溶性维生素的对比研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9093-9099.
TU XB, WANG SL, HUANG XD, *et al.* Comparative study of 2 kinds microplate kits for the determination of 3 kinds of water-soluble vitamins in milk powder [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9093-9099.
- [9] ZHANG LH, WANG KX, WANG M, *et al.* Application and discussion for the determination of vitamin B₁₂ in milk powder by microbiological method [J]. *China Dairy Ind*, 2008, 36(10): 58-60.
- [10] 王晶, 芦云, 师佳, 等. 2种国标方法检测婴幼儿奶粉中叶酸和泛酸含量比较[J]. *检验检疫科学*, 2019, 29(3): 77-78, 85.
WANG J, LU Y, SHI J, *et al.* Comparison of folic acid and pantothenic acid in infant milk powder by two national standard methods [J]. *Qual Saf Insp Test*, 2019, 29(3): 77-78, 85.
- [11] KAPIL B, MAHESH K, VIPIN S, *et al.* Microbiological assay for vitamin B [J]. *Int Res J Pharm*, 2012, 3(2): 74-82.
- [12] 李金霞, 催亚娟, 赵寅菲, 等. 微生物法测定食品中水溶性维生素的原理及进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 338-344.
LI JX, CUI YJ, ZHAO YF, *et al.* Principle and progress of microbial determination water soluble vitamins in food [J]. *Food Sci*, 2013, 34(13):

- 338-344.
- [13] 王赢, 袁振刚, 谢小钰, 等. 微孔板式微生物法快速测定婴儿奶粉中维生素 B₁₂ 的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 269-272.
WANG Y, YUAN ZG, XIE XY, *et al.* Research on the rapid determination of vitamin B₁₂ in foods for infants by the microbiological microtiter plate test [J]. Food Ind, 2015, 36(6): 269-272.
- [14] 李娜, 王一村, 王萌, 等. 奶粉中维生素 B₁₂ 及叶酸的检测方法对比[J]. 中国标准化, 2018, (5): 120-126.
LI N, WANG YC, WANG M, *et al.* Comparison of detection methods for vitamin B₁₂ and folic acid in milk powder [J]. China Stand, 2018, (5): 120-126.
- [15] 左程丽, 李端. 维生素的检测现状及国际标准检测方法[J]. 食品安全导刊, 2011, 10: 36-37.
ZUO CL, LI D. The current situation of vitamin detection and international standard detection methods [J]. Chin Food Saf Magaz, 2011, 10: 36-37.
- [16] 田浩, 王志伟, 顾文佳, 等. 微生物法测定食品中叶酸、泛酸、生物素、维生素 B₁₂ 注意事项和实践[J]. 中国标准化, 2018, (17): 127-130.
TIAN H, WANG ZW, GU WJ, *et al.* Matters needing attention and practical experience for microbiological method determination of folic acid, pantothenic acid, biotin and vitamin B₁₂ in foods [J]. China Stand, 2018, (17): 127-130.
- [17] 毛伟贞. 维生素的国际标准检测方法研究[J]. 中国高新技术企业, 2012, (14): 34-35.
MAO WZ. Study on international standard detection method of vitamins [J]. Chin High-Tech Enterp, 2012, (14): 34-35.
- [18] KARMI O, ZAYED A, BARAGHETHI S, *et al.* Measurement of vitamin B₁₂ concentration: A review on available methods [J]. IIOAB J, 2011, 2(2): 23-32.
- [19] 许书道. 定量分析方法评价[J]. 化学分析计量, 2002, 11(1): 30-31.
XU SD. Evaluation of quantitative analysis methods [J]. Chem Anal Meter, 2002, 11(1): 30-31.
- [20] 任成忠, 毛丽芬. 加标回收实验的实施及回收率计算的研究[J]. 工业安全与环保, 2006, (2): 9-11.
REN CZ, MAO LF. Study on implementation and calculation of standard addition recovery experiment [J]. Ind Saf Environ Prot, 2006, (2): 9-11.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



赵 平, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为生物产品开发、食品微生物检测与研究。
E-mail: 279225547@qq.com



杨 光, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全、微生物检测与研究。
E-mail: 41921995@qq.com