

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240912004

微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸、泛酸和生物素含量

姜华军*, 魏敏, 丁世杰

(威海市食品药品检验检测研究院, 威海 264210)

摘要: **目的** 建立微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中的叶酸、泛酸和生物素含量的方法。**方法** 按照国标方法分别提取婴幼儿配方乳粉中的叶酸、泛酸和生物素, 在 96 孔微孔板中接种含有相应测试菌悬液的培养基, 再分别加入标准系列溶液和试样提取液, 培养后用酶标仪测定吸光度, 根据标准曲线分别计算试样中的叶酸、泛酸和生物素含量, 并考察测定方法的检出限、精密度和加标回收率。**结果** 叶酸、泛酸和生物素标准曲线的相关系数均大于 0.999, 检出限分别为 0.10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、0.013 $\text{mg}/100\text{ g}$ 、0.57 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)分别为 1.02%、0.94%、1.08%, 加标回收率分别为 94.6%~100.0%、95.3%~103.3%、94.5%~100.1%。**结论** 该微孔板方法操作简单、成本较低, 结果准确性和重现性良好, 适用于婴幼儿配方乳粉中叶酸、泛酸和生物素含量的大批量检测。

关键词: 微孔板; 微生物法; 婴幼儿配方乳粉; 叶酸; 泛酸; 生物素

Determination of folic acid, pantothenic acid, and biotin content in infant formula milk powder by microplate microbial method

JIANG Hua-Jun*, WEI Min, DING Shi-Jie

(Weihai Institute for Food and Drug Control, Weihai 264210, China)

ABSTRACT: Objective To establish a microplate microbial method for the determination of the content of folic acid, pantothenic acid, and biotin in infant formula milk powder. **Methods** The folic acid, pantothenic acid, and biotin were extracted from infant formula milk powder according to the national standard methods. The culture mediums containing the corresponding test bacterial suspension were inoculated into a 96-well microplate, and then the standard series solutions and sample extraction solutions were added separately. The absorbance value was measured using a microplate reader after cultivation. The content of folic acid, pantothenic acid, and biotin in the sample were calculated according to the standard curve, and the limits of detection, precisions, and spiked recovery rates of the methods were investigated. **Results** The correlation coefficients of the standard curves for folic acid, pantothenic acid, and biotin were all greater than 0.999. The limits of detection were 0.10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 0.013 $\text{mg}/100\text{ g}$ and 0.57 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively. The relative standard deviations (RSDs) were 1.02%, 0.94% and 1.08%, respectively. The spiked recovery rates were 94.6%~100.0%, 95.3%~103.3% and 94.5%~100.1%, respectively. **Conclusion** This microplate method is simple, cost-effective, and has good accuracy and reproducibility of results. It is suitable for large-scale detection of folic acid,

*通信作者: 姜华军, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: huajun_jiang@126.com

*Corresponding author: JIANG Hua-Jun, Ph.D, Senior Engineer, Weihai Institute for Food and Drug Control, No.166-6, Chuangxin Road, Torch Hi-tech Science Park, Weihai 264210, China. E-mail: huajun_jiang@126.com

pantothenic acid, and biotin content in infant formula milk powder.

KEY WORDS: microplate; microbial method; infant formula milk powder; folic acid; pantothenic acid; biotin

0 引言

叶酸、泛酸、生物素是婴幼儿配方乳粉中添加的必需营养素,其含量水平对于婴幼儿生长发育有重要影响^[1-2]。目前对食品中叶酸、泛酸、生物素的测定最常用的是微生物法,其基本原理是利用微生物的生长与维生素含量呈相关性,根据微生物生长导致的培养液浑浊度的变化来测定维生素含量^[3-7]。此外还有液相色谱法^[8-13]、液相色谱-串联质谱法^[14-20]等仪器分析方法,但是适用范围有一定限制,而且样品处理较为复杂,检测成本较高。

微孔板式微生物法对传统微生物试管法检测体系进行了优化,近年来在多种维生素的检测中广泛应用^[21-24],且已列入多项国家标准中,在最新版的 GB 5009.211—2022《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》、GB 5009.210—2023《食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》、GB 5009.259—2023《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》中均增加了微孔板测定方法。本研究采用微孔板试剂盒对叶酸、泛酸、生物素的微孔板测定方法进行验证,试剂盒中包含有标准品、测定用菌株以及培养基,其中菌株为冻干菌球,直接加入培养基中混匀即可使用,不需按国标方法进行菌株的活化和菌悬液的制备。应用该方法对多种婴幼儿配方乳粉进行检测,以期对微孔板试剂盒在多种维生素检测中的应用提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

婴儿配方乳粉质控样品 QC-IP-705(中国检验检疫科学研究院); 15 种不同品牌的婴幼儿配方乳粉(孕婴用品店)。

氢氧化钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂); 无水乙醇、冰乙酸、硫酸(分析纯,烟台远东精细化工有限公司)。

叶酸微孔板法即用型试剂盒 GVT2001(北京陆桥技术股份有限公司): 内含叶酸标准品(纯度 89.97%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)、叶酸检测菌球(鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469)、叶酸测定培养基等。

泛酸微孔板法即用型试剂盒 GVT2004(北京陆桥技术股份有限公司): 内含泛酸标准品(纯度 95.50%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)、泛酸检测菌球(植物乳植杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014)、泛酸测定培养基等。

生物素微孔板法即用型试剂盒 GVT2003(北京陆桥技术股份有限公司): 内含生物素标准品(纯度 99.80%, 德国

Dr. Ehrenstorfer 公司)、生物素检测菌球(植物乳植杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014)、生物素测定培养基等。

1.2 仪器与设备

Quintix224-1CN 电子天平(精度 0.1 mg)、Tacta 手动移液器(德国 Sartorius 公司); AB2-4S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); BI-250A 生化培养箱(美国 STIK 公司); HVE-50 立式压力蒸汽灭菌器(日本 Hirayama 公司); V4DS025 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); KM-700DE 超声波振荡器(昆山美美超声仪器有限公司); SevenCompact S210 精密 pH 计(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Spark 10M 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试样提取

分别参照 GB 5009.211—2022、GB 5009.210—2023、GB 5009.259—2023 提取婴幼儿配方乳粉样品中的叶酸、泛酸和生物素。根据试样中 3 种维生素的含量,用水对提取液进行适当稀释,本研究中叶酸、泛酸、生物素试样提取液的稀释倍数分别为 50、50、1。

1.3.2 测定培养基制备

按试剂盒说明书,在无菌条件下,各取 1 支叶酸、泛酸、生物素测定培养基添加剂,分别加入 20 mL 相应的测定培养基基础中,充分混匀。各取 200 μ L 上述培养基于无菌离心管中备用,作为未接种 0 对照孔培养基。各取 1 支叶酸、泛酸、生物素检测菌球,分别加入剩余的测定培养基中,充分混匀作为接种测定培养基。

1.3.3 标准系列管制备

按试剂盒说明书,在无菌条件下,准确吸取 1.5 mL 无菌水分别加入叶酸、泛酸、生物素测定冻干标准品中,充分溶解混匀,再各取 1 mL 加入 4 mL 无菌水中混匀,即为叶酸、泛酸、生物素标准曲线工作液,质量浓度分别为 0.20、20.00、0.20 ng/mL。取无菌离心管(S1~S10)分别加入叶酸标准曲线工作液 0、50、100、200、300、400、500、600、800、1000 μ L,补无菌水至 1000 μ L,制备叶酸标准系列溶液;取无菌离心管(S1~S11)分别加入泛酸标准曲线工作液 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 μ L,补无菌水至 1000 μ L,制备泛酸标准系列溶液;取无菌离心管(S1~S9)分别加入生物素标准曲线工作液 0、100、200、300、400、500、600、800、1000 μ L,补无菌水至 1000 μ L,制备生物素标准系列溶液。所制备叶酸、泛酸、生物素标准系列溶液质量浓度见表 1。

表 1 叶酸、泛酸、生物素标准系列溶液质量浓度(ng/mL)
Table 1 Concentrations of folic acid, pantothenic acid, and biotin standard series solution (ng/mL)

标准管号	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
叶酸	0.00	0.00	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.16	0.20	/
泛酸	0.00	0.00	2.00	4.00	6.00	8.00	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	20.0
生物素	0.00	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.16	0.20	/	/

注: S0 为未接种 0 对照; / 表示系列溶液不包含该系列管, 表 2 同。

1.3.4 试样系列管制备

分别将叶酸、泛酸、生物素试样稀释液在无菌条件下用 0.22 μm 无菌水相滤膜过滤除菌。为保证试样稀释液中各物质浓度在标准曲线的浓度范围内, 按表 2 对试样稀释液再进行系列稀释。取 3 支无菌离心管, 分别加入叶酸试样稀释液 100、200、300 μL, 补无菌水至 500 μL, 制备叶酸试样系列溶液; 取 4 支无菌离心管, 分别加入泛酸试样稀释液 100、200、300、400 μL, 补无菌水至 500 μL, 制备泛酸试样系列溶液; 取 4 支无菌离心管, 分别加入生物素试样稀释液 100、200、300、400 μL, 补无菌水至 500 μL, 制备生物素试样系列溶液。

表 2 叶酸、泛酸、生物素试样系列溶液制备(μL)
Table 2 Preparation of folic acid, pantothenic acid, and biotin sample series solution (μL)

试样系列管号		1	2	3	4
叶酸	试样稀释液	100	200	300	/
	无菌水	400	300	200	/
泛酸	试样稀释液	100	200	300	400
	无菌水	400	300	200	100
生物素	试样稀释液	100	200	300	400
	无菌水	400	300	200	100

1.3.5 接种和培养

取无菌 96 孔微孔板, 在未接种 0 对照孔加入 150 μL 不含测试菌的未接种 0 对照培养基, 在其他微孔加入 150 μL 接种测定培养基, 再相应加入 150 μL 叶酸、泛酸、生物素标准系列溶液和试样系列溶液, 每个系列做 3 孔平行。用封板膜将微孔板密封, 并按压封板膜, 保证每个微孔充分密封。放入 36 °C±1 °C 培养箱中避光培养 40~48 h。

1.3.6 测定和计算

培养结束后, 取出微孔板, 再次按压封板膜, 保证各个微孔充分密封, 反复颠倒振荡, 使培养液充分混匀。对角揭开封板膜, 用针刺破各微孔表面的气泡, 用酶标仪在 550 nm 处测定吸光度值。

以标准系列管中叶酸、泛酸、生物素浓度为横坐标, 以每个标准点的吸光度均值为纵坐标, 分别绘制叶酸、泛酸、生物素标准曲线, 利用 ELISA Calc 软件拟合四参数曲线方程^[25-26]。根据标准曲线计算试样系列管中叶酸、泛酸、生物素的相应浓度。

试样稀释液中叶酸、泛酸、生物素浓度均按公式(1)计算。

$$\rho = \frac{c_x \times V}{V_x} \quad (1)$$

式中: ρ 为试样稀释液中叶酸、泛酸、生物素质量浓度, ng/mL; c_x 为通过标准曲线计算所得试样系列管中叶酸、泛酸、生物素的质量浓度, ng/mL; V 为试样系列管溶液定容体积, mL; V_x 为制备试样系列管时吸取的试样稀释液体积, mL。

试样中叶酸、泛酸、生物素含量分别按公式(2)~(4)计算。

$$X_1 = \frac{\bar{\rho}_1 \times V_1 \times f_1}{m_1} \times \frac{100}{1000} \quad (2)$$

式中: X_1 为试样中叶酸含量, μg/100 g; $\bar{\rho}_1$ 为试样稀释液中叶酸浓度平均值, ng/mL; V_1 为叶酸试样提取液定容体积, mL; f_1 为叶酸试样提取液稀释倍数; m_1 为试样质量, g; $\frac{100}{1000}$ 为换算系数。

$$X_2 = \frac{\bar{\rho}_2 \times V_2 \times f_2}{m_2} \times \frac{100}{10^6} \quad (3)$$

式中: X_2 为试样中泛酸含量, mg/100 g; $\bar{\rho}_2$ 为试样稀释液中泛酸浓度平均值, ng/mL; V_2 为泛酸试样提取液定容体积, mL; f_2 为泛酸试样提取液稀释倍数; m_2 为试样质量, g; $\frac{100}{10^6}$ 为换算系数。

$$X_3 = \frac{\bar{\rho}_3 \times V_3}{m_3} \times \frac{V_4}{V_5} \times f_3 \times \frac{100}{1000} \quad (4)$$

式中: X_3 为试样中生物素含量, μg/100 g; $\bar{\rho}_3$ 为试样稀释液中生物素浓度平均值, ng/mL; V_3 为生物素试样提取液过滤后定容体积, mL; V_4 为过滤前定容体积, mL; V_5 为过滤后吸取滤液的体积, mL; f_3 为生物素试样提取液稀释倍数; m_3 为试样质量, g; $\frac{100}{1000}$ 为换算系数。

1.4 数据处理

利用 ELISA Calc 软件, 采用四参数方程拟合标准曲线, 得到曲线方程和线性相关系数。对试样空白重复测定 10 次, 采用空白标准偏差法计算方法检出限。对同一样品重复测定 6 次, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来表示精密度, RSD 越小, 精密度越高。向同一样品中分别添

加低、中、高 3 个浓度水平的标准溶液, 进行测定, 计算加标回收率, 回收率越接近 100%, 准确度越高。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

采用四参数方程拟合标准曲线, 如图 1~3 所示, 线性范围、线性方程和相关系数见表 3。叶酸、泛酸、生物素标准曲线的线性范围分别与 GB 5009.211—2022、GB 5009.210—2023、GB 5009.259—2023 的微生物法一致, 线性相关系数均大于 0.999。在 GB 5009.210—2023 泛酸的测定标准中指明采用四参数曲线拟合, 而在 GB 5009.211—2022 叶酸、GB 5009.259—2023 生物素的测定标准中并未指明标准曲线的拟合方式, 常见的有直线拟合、二次或三次曲线拟合。从本研究结果来看, 四参数曲线拟合同样适用于叶酸、生物素的测定, 所得到的标准曲线线性关系较好。

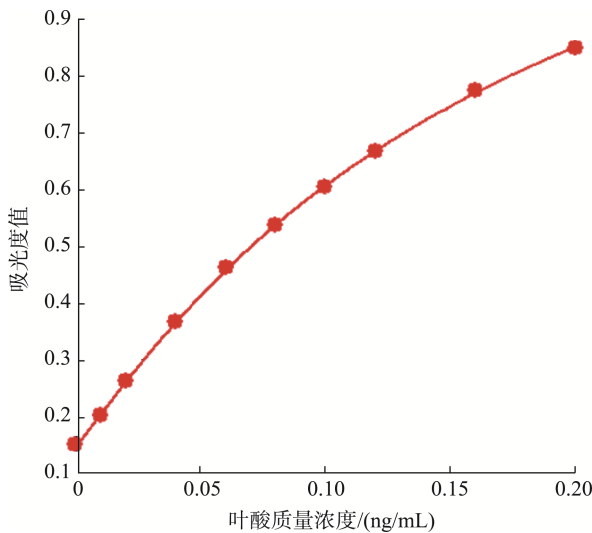


图 1 叶酸标准曲线
Fig.1 Standard curve of folic acid

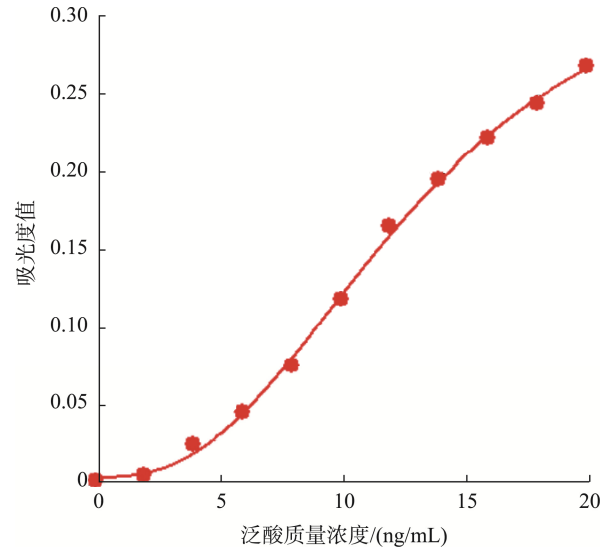


图 2 泛酸标准曲线
Fig.2 Standard curve of pantothenic acid

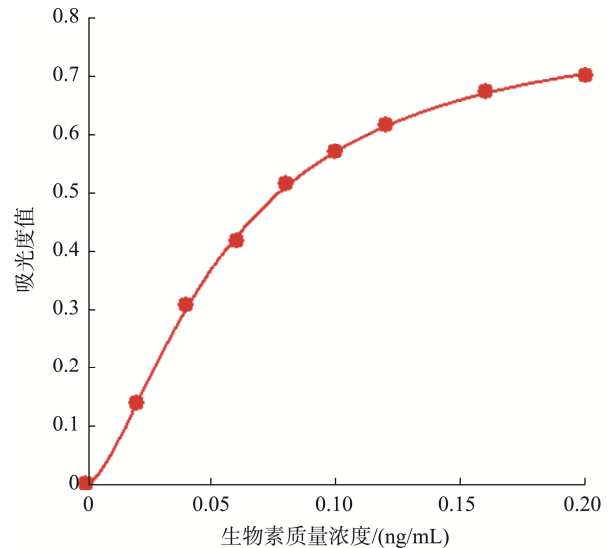


图 3 生物素标准曲线
Fig.3 Standard curve of biotin

表 3 线性范围、标准曲线方程和相关系数

Table 3 Linear range, standard curve equation, and correlation coefficient

检测项目	线性范围/(ng/mL)	标准曲线方程	相关系数(<i>r</i>)
叶酸	0.00~0.20	$y = \frac{1.46275 - 0.15221}{1 + (\frac{x}{0.18378})^{-1.07739}} + 0.15221$	0.9999
泛酸	0.00~20.00	$y = \frac{0.35273 - 0.00489}{1 + (\frac{x}{13.04226})^{-2.59092}} + 0.00489$	0.9994
生物素	0.00~0.20	$y = \frac{0.80197 - 0.00917}{1 + (\frac{x}{0.05534})^{-1.54505}} + 0.00917$	0.9998

2.2 检出限

按照 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中的空白标准偏差法评估检出限。对试样空白独立测定 10 次, 根据标准曲线得到试样空白浓度, 计算试样空白浓度平均值和标准偏差(s), 试样空白浓度平均值+ $3s$ 为最低检出浓度, 带入公式计算方法检出限, 结果见表 4。叶酸的方法检出限($0.10 \mu\text{g}/100 \text{g}$), 优于 GB 5009.211—2022 中叶酸的检出限($0.5 \mu\text{g}/100 \text{g}$); 泛酸的方法检出限($0.013 \text{mg}/100 \text{g}$), 优于 GB 5009.210—2023 中泛酸的

表 4 检出限测定结果

Table 4 Determination results of limit of detection

检测项目	试样空白浓度平均值/(ng/mL)	标准偏差(s)/(ng/mL)	检出限
叶酸	0.007739	0.0007908	$0.10 \mu\text{g}/100 \text{g}$
泛酸	2.099	0.1943	$0.013 \text{mg}/100 \text{g}$
生物素	0.001980	0.0001001	$0.57 \mu\text{g}/100 \text{g}$

检出限($0.025 \text{mg}/100 \text{g}$); 生物素的方法检出限($0.57 \mu\text{g}/100 \text{g}$), 以 3 倍的方法检出限即 $1.71 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 为方法定量限, 优于 GB 5009.259—2023 中生物素的定量限($2.5 \mu\text{g}/100 \text{g}$)。

2.3 重复性实验

对某品牌同一批次的婴幼儿配方乳粉样品中的叶酸、泛酸、生物素含量重复测定 6 次, 计算 RSDs, 来表示精密度, 结果见表 5。叶酸、泛酸、生物素重复测定的 RSDs 分别为 1.02%、0.94%、1.08%, 表明该方法精密度高, 重现性好。

2.4 加标回收实验

向某婴幼儿配方乳粉样品中分别添加 3 个浓度水平的叶酸、泛酸、生物素标准溶液, 采用微孔板法检测, 计算加标回收率, 结果见表 6。叶酸、泛酸、生物素的加标回收率分别为 94.6%~100.0%、95.3%~103.3%、94.5%~100.1%, 表明准确度较高。

表 5 重复性实验结果

Table 5 Results of repeatability experiment

检测项目	重复测定结果						平均结果	RSDs/%
	1	2	3	4	5	6		
叶酸/ $(\mu\text{g}/100 \text{g})$	76.58	78.07	76.16	77.91	76.61	77.42	77.13	1.02
泛酸/ $(\text{mg}/100 \text{g})$	3.196	3.212	3.142	3.168	3.154	3.140	3.169	0.94
生物素/ $(\mu\text{g}/100 \text{g})$	16.07	16.37	16.44	16.16	16.19	16.51	16.29	1.08

表 6 加标回收实验结果

Table 6 Results of spiked recovery experiment

检测项目	加标量	样品本底值	加标样测定值	回收率/%
叶酸/ $(\mu\text{g}/100 \text{g})$	5.00		81.86	94.6
	25.00	77.13	101.66	98.1
	50.00		127.15	100.0
泛酸/ $(\text{mg}/100 \text{g})$	0.300		3.479	103.3
	1.500	3.169	4.598	95.3
	3.000		6.052	96.1
生物素/ $(\mu\text{g}/100 \text{g})$	2.00		18.18	94.5
	10.00	16.29	26.20	99.1
	20.00		36.31	100.1

2.5 质控样品检测

采用该微孔板方法对婴儿配方乳粉质控样品 QC-IP-705 进行检测, 结果见表 7。叶酸、泛酸、生物素的测定结果均在特性值区间范围内。

2.6 实际样品检测

采用该微孔板方法对 15 批次不同品牌的市售婴幼儿配方乳粉样品进行检测, 结果见表 8。测定结果均符合产

品明示值的要求。

表 7 质控样品测定结果

Table 7 Detection results of quality control sample

检测项目	特性值	特性值区间	测定值
叶酸/ $(\mu\text{g}/100 \text{g})$	147.05	119.41~174.69	138.67
泛酸/ $(\text{mg}/100 \text{g})$	4.965	4.284~5.646	4.850
生物素/ $(\mu\text{g}/100 \text{g})$	28.00	21.83~34.17	26.11

表 8 实际样品测定结果
Table 8 Measurement results of actual samples

样品	叶酸/($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		泛酸/($\text{mg}/100\text{ g}$)		生物素/($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	
	标示值	测定值	标示值	测定值	标示值	测定值
样品 1 (1 段)	82.6	77.13	2.990	3.169	16.0	16.29
样品 2 (1 段)	82.6	75.51	2.990	3.300	16.0	16.44
样品 3 (1 段)	72.8	66.32	2.898	3.511	15.4	14.96
样品 4 (1 段)	70.0	80.51	2.660	3.123	16.0	16.75
样品 5 (1 段)	88.2	92.10	3.344	3.770	12.6	13.29
样品 6 (2 段)	52.5	52.86	3.284	4.231	22.0	25.54
样品 7 (2 段)	66.5	70.15	3.019	3.178	21.0	19.72
样品 8 (2 段)	93.8	86.57	2.993	2.960	25.71	25.34
样品 9 (3 段)	62.0	122.81	2.700	2.851	19.0	19.26
样品 10 (3 段)	51.0	49.59	3.738	3.520	15.4	15.00
样品 11 (3 段)	50.0	65.79	2.850	3.461	11.5	11.62
样品 12 (3 段)	76.0	88.22	3.200	3.765	16.0	16.97
样品 13 (3 段)	98.2	97.55	3.192	3.027	26.92	26.15
样品 14 (3 段)	78.0	81.19	3.250	3.317	15.00	15.45
样品 15 (3 段)	72.7	82.54	3.376	3.444	16.01	16.46

3 讨论与结论

本研究采用微孔板试剂盒测定婴幼儿配方乳粉中的叶酸、泛酸和生物素,采用四参数方程拟合标准曲线,并考察检测方法的检出限、精密性、加标回收率。叶酸、泛酸和生物素标准曲线的线性相关系数均大于 0.999,检出限或定量限分别优于 GB 5009.211—2022、GB 5009.210—2023、GB 5009.259—2023 的微生物方法,多次重复测定的 RSDs 均不超过 5%,表明精密性较高,不同浓度水平的加标回收率均符合要求,对质控样品的测定结果均在特性值区间范围内,表明方法的准确度较高。

微孔板法与传统的微生物试管培养法相比,不需使用大量的试管等玻璃器皿,节省了器皿清洗、灭菌的流程,而且很大程度上减少了标准品、培养基等消耗品的使用^[27-30]。另外微孔板法吸光度值的测定采用酶标仪,能够一次性读取 96 孔数据,与试管法的分光光度计测定相比大大节省了测定时间。由此可见,微孔板法能够有效降低实验成本、减少工作量、提高检测效率,适合于婴幼儿配方乳粉样品的高通量检测。

参考文献

- [1] 于瑞莉,冯永巍,黄丽俊,等.特殊食品中 3 种 B 族维生素检测方法的研究进展[J].食品与药品,2022,24(1):91-96.
YU RL, FENG YW, HUANG LJ, *et al.* Progress on determination of three kinds of B vitamins in special food [J]. Food Drug, 2022, 24(1): 91-96.
- [2] 杜柳珊,周颖璇.市售婴幼儿配方奶粉中 4 种 B 族维生素指标监测结果分析[J].广东化工,2022,49(22):186-188,191.
DU LS, ZHOU YX. Analysis of monitoring results of 4 kinds of B vitamins in commercial infant formula [J]. Guangdong Chem Ind, 2022, 49(22): 186-188, 191.
- [3] MARTIN F, GIMÉNEZ EC, KONINGS E. New methods for the analysis of water-soluble vitamins in infant formula and adult/pediatric nutritionals [J]. J AOAC Int, 2016, 99(1): 19-25.
- [4] 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.
- [5] 贺燕,钟菲菲,王晓庆,等.微生物法测定婴幼儿奶粉中泛酸含量的研究[J].食品与机械,2022,38(6):77-81.
HE Y, ZHONG FF, WANG XQ, *et al.* Determination of pantothenic acid in infant milk powder by microbiological method [J]. Food Mach, 2022, 38(6): 77-81.
- [6] 丁松乔,杨光,赵平,等.微生物法测定婴幼儿配方乳粉中生物素的含量[J].中国检验检疫,2023,31(2):35-38.
DING SQ, YANG G, ZHAO P, *et al.* Determination of the content of biotin in infant formula milk powder by microbial method [J]. China Insp Body Lab, 2023, 31(2): 35-38.
- [7] 陈明瑶,赵胤丞,张联琴,等.微生物法测定婴幼儿奶粉中泛酸的优化

- 研究[J]. 食品安全导刊, 2024(19): 97–102.
- CHEN MY, ZHAO YC, ZHANG LQ, *et al.* Optimization study on microbial method for determining pantothenic acid in infant milk powder [J]. *China Food Saf Magaz*, 2024(19): 97–102.
- [8] ZAFRA-GÓMEZ A, GARBALLO A, MORALES JC, *et al.* Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(13): 4531–4536.
- [9] MÁRQUEZ-SILLERO I, CÁRDENAS S, VALCÁRCEL M. Determination of water-soluble vitamins in infant milk and dietary supplement using a liquid chromatography on-line coupled to a corona-charged aerosol detector [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1313: 253–258.
- [10] TEMOVA RŽ, GROBIN A, ROŠKAR R. A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method [J]. *Food Chem*, 2021, 337: 127768.
- [11] 姚瑛, 付晖, 李群, 等. 高效液相色谱法测定保健食品多维康胶囊中叶酸的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1850–1854.
- YAO Y, FU H, LI Q, *et al.* Determination of folic acid in health food Duoweikang capsule by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(5): 1850–1854.
- [12] 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.
- [13] 张丽芳, 张鑫, 周鑫, 等. 高效液相色谱法同时测定婴幼儿奶粉中 7 种水溶性维生素[J]. 食品工业, 2022, 43(1): 277–280.
- ZHANG LF, ZHANG X, ZHOU X, *et al.* Simultaneous determination of seven water soluble vitamins in infant milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *Food Ind*, 2022, 43(1): 277–280.
- [14] 李菁菁, 叶润, 崔亚娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定配方奶粉中泛酸、生物素和氰钴胺素[J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 61–64.
- LI JJ, YE R, CUI YJ, *et al.* Determination of pantothenic acid, biotin, cyanocobalamine in formula milk powder using ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(12): 61–64.
- [15] GILL BD, SALDO S, WOOD JE, *et al.* A rapid method for the determination of biotin and folic acid in liquid milk, milk powders, infant formula, and milk-based nutritional products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(5): 1578–1583.
- [16] GILL BD, SALDO SC, MCGRAIL II, *et al.* Rapid method for the determination of thiamine and pantothenic acid in infant formula and milk-based nutritional products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2020, 103(3): 812–817.
- [17] 孙宇, 周璇, 朱桂芳, 等. 超高效液相色谱-同位素稀释质谱法测定食品中的泛酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6594–6599.
- SUN Y, ZHOU X, ZHU GF, *et al.* Determination of pantothenic acid in food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(16): 6594–6599.
- [18] 卢兰香, 薛霞, 魏莉莉, 等. 特殊医学用途婴儿配方食品中生物素含量的测定[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 267–274.
- LU LX, XUE X, WEI LL, *et al.* Determination of biotin content in infant formulas for special medical purposes [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(3): 267–274.
- [19] 江蓝蓝, 刘庆, 钟俊威. 婴儿配方食品中生物素含量的测定[J]. 食品安全导刊, 2022(32): 102–105.
- JIANG LL, LIU Q, ZHONG JW. Determination of biotin content in infant formulas [J]. *China Food Saf Magaz*, 2022(32): 102–105.
- [20] 陈秀梅, 闫慧娟, 张晓敏, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方乳粉中 10 种水溶性维生素[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(4): 40–47.
- CHEN XM, YAN HJ, ZHANG XM, *et al.* Simultaneous determination of 10 water-soluble vitamins in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2023, 46(4): 40–47.
- [21] 王晶, 张攀, 李玲, 等. 微孔板式微生物法检测婴幼儿配方乳粉中生物素含量方法研究[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 346–348, 353.
- WANG J, ZHANG P, LI L, *et al.* Determination of biotin in infant formula milk powder based on microplate microbiological method [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(11): 346–348, 353.
- [22] 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 of 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.
- [23] 赵平, 郭莹莹, 王玉芝, 等. 微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中泛酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3294–3299.
- ZHAO P, GUO YY, WANG YZ, *et al.* Determination of pantothenic acid content in infant formula milk powder by microplate microbial method [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(8): 3294–3299.
- [24] 王晶, 林泽栋, 李艳, 等. 微孔板式微生物法检测乳粉中叶酸的质量分数[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(11): 50–53.
- WANG J, LIN ZD, LI Y, *et al.* Study on the determination of folic acid in milk powder by micro-plate microbiological method [J]. *China Dairy Ind*, 2021, 49(11): 50–53.
- [25] 周敏, 许再元, 苏水娇, 等. 微孔板试剂盒法测定婴幼儿配方奶粉中的生物素含量[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(12): 2246–2248.

- ZHOU M, XU ZY, SU SJ, *et al.* Determination of biotin content in infant formula milk powder by microplate kit method [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2017, 58(12): 2246–2248.
- [26] 陈琼, 王子威, 辛博, 等. 微生物法测定特殊食品中叶酸含量的研究[J]. *食品科技*, 2023, 48(1): 240–245.
- CHEN Q, WANG ZW, XIN B, *et al.* Determination of folate content in special foods by microbial method [J]. *Food Sci Technol*, 2023, 48(1): 240–245.
- [27] 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.
- [28] 郭莹莹, 杨光, 李兴霖, 等. 微孔板式微生物法与国标微生物法测定婴幼儿配方乳粉中泛酸含量的比较[J]. *现代食品*, 2021(7): 152–155.
- GUO YY, YANG G, LI XL, *et al.* Comparison of microplate microbiological method and national standard microbiological method for determination of pantothenic acid content in infant formula milk powder [J]. *Mod Food*, 2021(7): 152–155.
- [29] 孙丛丛, 李鹏, 李玉平, 等. 婴幼儿配方乳粉中泛酸检测国家标准微生物法与试剂盒法比对探究[J]. *现代食品*, 2022, 28(6): 170–173, 186.
- SUN CC, LI P, LI YP, *et al.* The comparison of pantothenic acid determination by national standard microbiological method and the kit detection in infant formula milk powder [J]. *Mod Food*, 2022, 28(6): 170–173, 186.
- [30] 王琳帆, 李晓南, 陈奕杉, 等. 试剂盒法与传统微生物法检测生物素比对试验[J]. *中国食品工业*, 2023(23): 68–71.
- WANG LF, LI XN, CHEN YS, *et al.* The comparison experiment of the kit method and traditional microbial method for determination of biotin [J]. *China Food Ind*, 2023(23): 68–71.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



姜华军, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。
E-mail: huajun_jiang@126.com