

ICS
CCS

团体标准

T/CIFST XXX-20XX

乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测方法

Quantitative determination method of L/D-lactic acid produced
by lactic acid bacteria

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会 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专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测方法

1 范围

本文件描述了乳酸菌发酵液中 L/D-乳酸的高效液相色谱测定方法。
本文件适用于乳酸菌产 L/D-乳酸含量的测定。

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本文件必不可少的条款。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 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

高效液相色谱 high performance liquid chromatography; HPLC

高效液相色谱法是采用高压输液泵将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱，对供试品进行分离测定的色谱方法。

3.2

乳酸菌 lactic acid bacteria

一类能利用碳水化合物发酵产生乳酸的细菌的通称。

4 原理

乳酸菌在适宜的条件下培养，将发酵液稀释净化后，采用高效液相色谱结合手性色谱柱分析。在手性配位交换色谱柱中，金属离子（ Cu^{2+} ）与固定相的手性配体形成稳定的金属-配体络合物，样品中乳酸的两种光学异构体通过与已形成的金属-配体络合物发生配位交换，形成暂时性的络合物。两种光学异构体-金属-配体络合物稳定性不同，其在色谱柱中的保留时间不同而实现分离，并通过检测器检测，依据保留时间定性，外标法定量。

5 仪器设备

5.1 分析天平：精度 0.0001 g。

5.2 离心机：转速 ≥ 12000 r/min。

5.3 高效液相色谱仪，配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.4 手性色谱柱。

5.5 生物安全柜。

- 5.6 高压灭菌锅。
- 5.7 涡旋混合器。
- 5.8 恒温培养箱：37℃±1℃。
- 5.9 厌氧培养装置：厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋或能提供同等厌氧效果的装置。
- 5.10 冰箱：2℃~8℃。
- 5.11 微量可调移液器及配套吸头：0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL。

6 试剂或材料

除特别说明外，仅使用分析纯或生化试剂，实验用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.1 试剂

- 6.1.1 半胱氨酸盐酸盐。
- 6.1.2 硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）。
- 6.1.3 L-乳酸或 L-乳酸盐标准品，D-乳酸或 D-乳酸盐标准品：纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

6.2 试剂和培养基配制

- 6.2.1 半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基：见附录 A。
- 6.2.2 1.2 mmol/L 硫酸铜水溶液：准确称取 0.299 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 于 250 mL 烧杯中，加入约 200 mL 超纯水，加热充分溶解后定容至 1000 mL，经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

6.3 标准溶液配制

- 6.3.1 L-乳酸或 L-乳酸盐标准储备液（4.0 mg/mL）、D-乳酸或 D-乳酸盐标准储备液（4.0 mg/mL）：分别准确称取 100.0 mg 的 L-乳酸或 L-乳酸盐标准品、D-乳酸或 D-乳酸盐标准品，精确至 0.1 mg，加入 10 mL 水溶解并转移至 25 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，置于 4℃ 条件下保存。
- 6.3.2 L/D-乳酸或 L/D-乳酸盐混合标准中间液（800 μg/mL）：分别吸取 2 mL 6.3.1 的 L-乳酸或 L-乳酸盐标准储备液、D-乳酸或 D-乳酸盐标准储备液，置于 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，置于 4℃ 条件下保存。
- 6.3.3 L/D-乳酸或 L/D-乳酸盐混合标准系列工作液：分别吸取适量 6.3.2 的 L/D-乳酸混合标准中间液或 L/D-乳酸盐混合标准中间液，用水稀释配制浓度为 1.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、40.0 μg/mL、80.0 μg/mL、160.0 μg/mL、200.0 μg/mL 的标准系列工作液，临用现配。

注：标准溶液的配制浓度以乳酸光学手性体单体计算。

6.4 材料

微孔滤膜：0.22 μm，水相。

无菌接种环：10 μL。

7 检测程序

乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测程序见图 1。

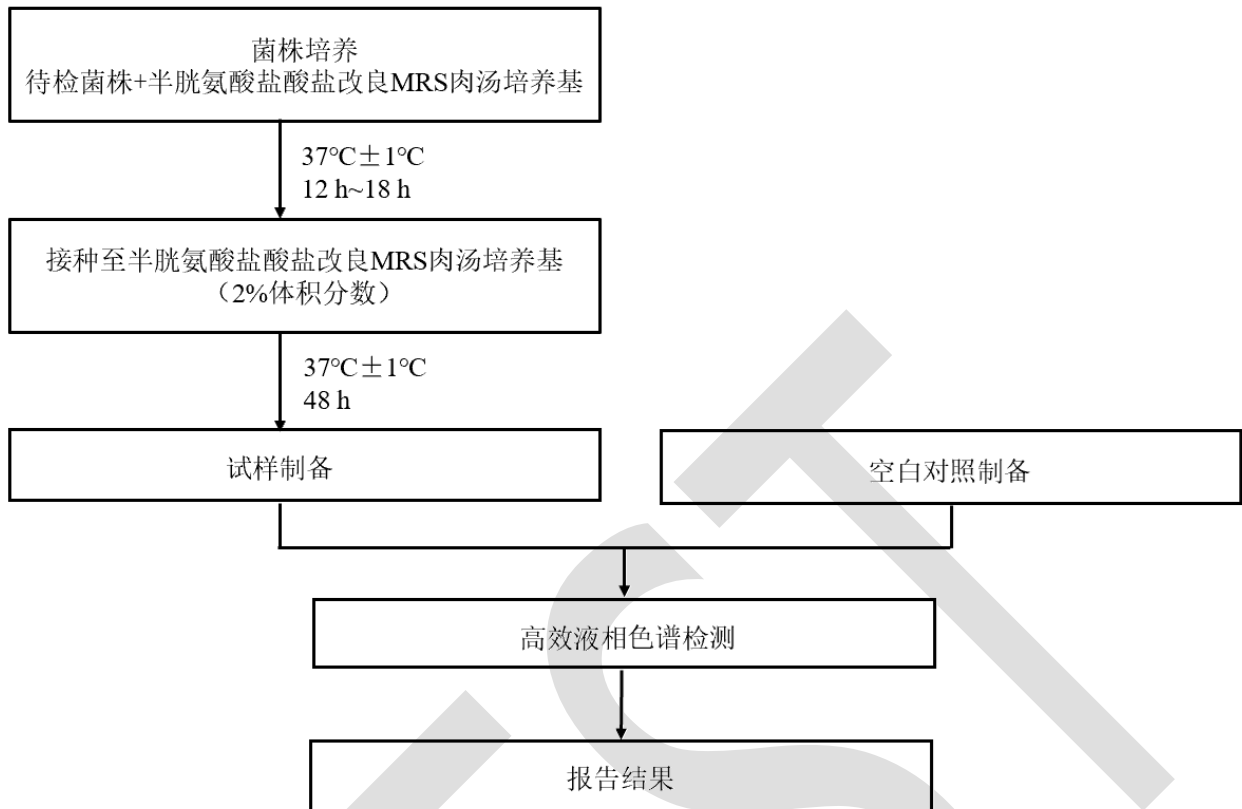


图 1 乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测程序

8 分析步骤

8.1 菌株培养及制备

8.1.1 菌株培养：将纯培养待检菌株接种于半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基中，37 °C±1 °C 培养 12 h~ 18 h。将活化的菌株培养液按 2%（体积分数）接种量转接至半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基中，在相同培养条件下培养 48 h。其中，双歧杆菌属需厌氧培养。

8.1.2 试样溶液制备：将上述发酵液混匀，取适量体积经 12000 r/min 离心 2 min，取上清液稀释适当倍数（终浓度在标曲范围内）后，经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

8.1.3 空白对照制备：取适量体积的半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基，经 12000 r/min 离心 2 min，取上清液稀释相同倍数后，经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

8.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：以配位交换型光学活性固定相涂敷或键合于二氧化硅为填充剂的手性色谱柱（φ4.6 mm×50 mm，3 μm），或性能相当的色谱柱；

b) 柱 温：25°C；

c) 流动相：1.2 mmol/L 硫酸铜水溶液；

d) 流 速：0.5 mL/min；

e) 检测器：紫外或二极管阵列检测器，检测波长：254 nm；

f) 进样量：10 μL。

8.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤，分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积。以标准系列工作液的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。

8.4 试样溶液的测定

将试样溶液和空白对照分别注入高效液相色谱仪中，测得相应峰面积，以保留时间定性。根据标准曲线分别计算待测溶液中 L-乳酸和 D-乳酸的含量。

9 结果计算与表述

9.1 结果计算

试样中 L-乳酸和 D-乳酸含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{C_1 \times N_1 - C_2 \times N_2}{1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X —— 样品中 L 乳酸或 D-乳酸含量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

C₁ —— 由标准曲线求得试样溶液中被测组分的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

C₂ —— 由标准曲线求得空白对照中被测组分的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

N₁ —— 试样溶液稀释倍数；

N₂ —— 空白对照稀释倍数；

1000 —— 换算系数。

测定结果用重复测定的算数平均值表示，结果保留三位有效数字。

9.2 结果表述

检测结果表述为：检出 D-乳酸含量为“×× mg/mL”；L-乳酸含量为“×× mg/mL”。

10 检出限和定量限

本方法的检出限为 0.25 μg/mL，定量限为 0.80 μg/mL。

附录 A
(资料性)

半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基

A.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	10.0 g
酵母浸粉	5.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g
醋酸钠 $\cdot 3H_2O$	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05 g

A.2 半胱氨酸盐酸盐储备液

称取 500 mg 半胱氨酸盐酸盐加入到 10 mL 蒸馏水中, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 临用现配。

A.3 制法

将 A.1 成分加入到 990 mL 蒸馏水中, 溶解, 调节 pH 至 6.2 ± 0.2 , 分装后 121℃ 高压灭菌 15 min。临用时用无菌注射器将半胱氨酸盐酸盐储备液制备加入, 使培养基中半胱氨酸盐酸盐的浓度为 500 $\mu g/mL$ 。
