

# 《食品中叶酸的测定 预包被微孔板式微生物法》

## 编制说明

### 一、工作简况

#### （一）任务来源、起草单位、起草人

##### 1. 背景

叶酸（Folic Acid），也称为也被称为维生素 B9，属于水溶性维生素的一种。叶酸是由蝶啶、对氨基苯甲酸和数量不等的酪氨酸 3 部分组成，是一种重要的 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。人体缺乏叶酸容易导致胃肠功能紊乱、智力退化及神经管畸形。虽然叶酸天然存在许多食品中，但是含量较低，不能满足一些人群的生理需求，同时人体不能自己合成叶酸，只能通过食物获得，因此叶酸是食物中需要补充的营养素之一。

《GB 14880-2012 食品营养强化剂使用标准》对叶酸作为食品营养强化剂的使用范围及使用量作了具体规定。目前，对叶酸含量进行检测的标准方法主要包括三类，分别是微生物法、表面等离子共振法和高效液相色谱法。国内叶酸含量的标准检测方法为《GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》，方法中规定了食品中叶酸的测定方法，采用微生物法，利用鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus casei* spp. *rhannosus*（ATCC 7469）对叶酸的特异性和灵敏性，定量测定出叶酸的含量。但国标采用微生物法，检测实验操作步骤复杂，每一次实验都需进行菌株的活化、转种、培养、测试菌液制备和培养基配制等人工操作步骤，对检测技术人员的专业技能要求较高，存在检测耗时长和重复性差等问题。而食品行业日常生产质控、食品安全监管部门开展食品安全监督检验、第三方检测机构为社会提供食品检验技术服务，均需要更加操作简便、经济高效、结果准确、适用性广的检测方法，现有标准方法尚不能完全满足。

在微生物法的基础上，为改善微生物培养过程中一系列影响检测技术性能的问题，国内外开展了大量基于微孔板式微生物法的检测技术研究，并开发出多种商业化的检测试剂产品。其中，德国 R-Biopharm AG 开发的 VitaFast®Folic Acid 检测方法因突出的技术性能受到研究者的关注，并在国内外食品行业获得广泛应用。该检测方法通过了 AOAC 性能测试方法计划（AOAC® Performance Tested Methods<sup>SM</sup> Program）的评估（证书号：100903）。

VitaFast®Folic Acid 检测方法同样采用 GB 5009.211-2014 中规定的鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus casei* spp. *rhannosus*（ATCC 7469），在预包被菌种的微孔中加入培养基和梯度浓度的叶酸标准品/待测样品，可对婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、特殊医学用途配

方食品、乳粉其调制产品、饮料类、片剂、胶囊、粉剂类型保健食品、糖果、谷物及谷物食品等多种食品进行叶酸的检测。该检测方法对食品中叶酸的微生物法检测进行了改进，以预包被菌种、检测试剂商品化和操作步骤简便化为特征。将鼠李糖乳杆菌预包被至微孔中，省略了菌种保存和传代中存在的失活、变异和污染等问题。标准品和预配的干粉培养基仅需在使用前加入无菌水后简单处理即可使用，避免了大量检测试剂在实验室人工配制导致的检测结果重复性和再现性差等缺点，并且显著的提高了工作效率。据不完全统计，在 FAPAS 能力验证中，有 13 家单位采用 VitaFast®Folic Acid 开展叶酸的定量检测，均获得“满意”评价。

## 2. 任务来源

任务来自《中国食品科学技术学会关于发布 2021 年团体标准立项计划的通知》（中食学字[2021]第 030 号）。

## 3. 起草单位及起草人

起草单位：

起草人：

### （二）起草过程

项目组 2018 年开始关注食品中叶酸含量快速检测技术，2018 年 1 月起开始利用半年时间完成系统性资料调研工作，并利用资料调研成果，自 2018 年 6 月起转入应用性实验研究等后续工作流程。项目组 2018 年 4 月开始进行食品中叶酸含量的预包被微孔板式微生物法的应用性实验研究，并与《GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》进行技术性能比对。基于上述工作成果，项目组 2021 年 8 月申报中国食品科学技术学会团体标准项目。标准立项后，项目组通过在线会议等方式，完成了标准文本和编制说明，经过讨论并征求相关专家意见，形成征求意见稿。

## 二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

现行国家标准中，《GB 14880-2012 食品营养强化剂使用标准》规定叶酸可以作为食品营养强化剂，允许使用的食品类别及其允许使用量范围分别为调制乳（仅限孕产妇用调制乳）（400 µg/kg~1200 µg/kg）、调制乳粉（儿童用乳粉和孕产妇乳粉除外）（2000 µg/kg~5000 µg/kg）、调制乳粉（儿童用乳粉）（420 µg/kg~3000 µg/kg）、调制乳粉（仅限孕产妇乳粉）（2000 µg/kg~8200 µg/kg）、大米（仅限免淘洗大米）（1000 µg/kg~3000 µg/kg）、小麦粉（1000 µg/kg~3000 µg/kg）、即食谷物，包括碾轧燕麦（片）（1000 µg/kg~2500 µg/kg）、饼干（390 µg/kg~780 µg/kg）其他焙烤食品（2000 µg/kg~7000 µg/kg）、果蔬汁（肉）饮料（包括发酵型产品等）（157 µg/kg~313 µg/kg）、固体饮料类（600 µg/kg~6000 µg/kg）和果

冻（50 µg/kg~100 µg/kg）。

目前，我国现行食品中叶酸检测方法标准只有《GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》。

### 三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

AOAC 方法中，涉及叶酸含量测定的官方方法主要有五个：《AOAC OM 960.46 微生物法检测维生素通用性标准》、《AOAC OM 944.12 微生物法测定维生素制剂中的叶酸》、《AOAC OM 992.05 微生物方法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸总量》、《AOAC OM 2011.05 婴儿配方乳粉和成人儿童营养品中叶酸的测定 表面等离子共振法》和《AOAC OM 2004.05 微生物-三酶法测定谷物和谷物食品中的叶酸》。其中，AOAC OM 960.46、AOAC OM 944.12、AOAC OM 992.05、AOAC OM 2004.05 均采用微生物法进行叶酸含量的测定。AOAC OM 2011.05 采用表面等离子共振法进行叶酸含量的测定。

### 四、标准的制（修）订与起草原则

本标准按照《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》和《GB/T 20001.4-2015 标准编写规则 第4部分：试验方法标准》给出的规则起草。

本标准技术内容是采用 VitaFast®Folic Acid 预包被微孔板式微生物法测定叶酸，并根据《GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中附录-方法回收率，结合标准制定项目组以往起草国家标准和行业标准的经验，拟定了应用性验证评价方案并加以实施，对本标准的技术性能参数进行各项指标评估，并与现行国家标准《GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》进行了性能比对。

### 五、确定各项技术内容的依据

本标准的技术原理是利用叶酸是鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus casei* spp. *ramnosus* (ATCC 7469) 生长所必需的营养素，将鼠李糖乳杆菌预包被至微孔中，在微孔中加入培养基和梯度浓度的叶酸标准品或适度稀释的待测样品，置 37 °C 避光培养 44 h~48 h，在波长 610 nm~630 nm 或 540 nm~550 nm 测定吸光度值，绘制标准曲线，根据标准曲线计算出待测样品中叶酸的含量。

#### （一）评估标准

根据《GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中附录-方法回收率，并结合实际经验，拟定了本标准检测方法的技术性能参数评估（见表1），以此来进行本标准检测方法的技术性能参数评估。

#### （二）灵敏度

##### 1. 检出限（LOD）

以检出限（LOD）作为灵敏度评价指标。检测限的计算公式为： $LOD = \bar{X} + 3 \times SD$ 。其中，

$\bar{X}$  为重复测定空白样品的平均值， $SD$  为重复测定空白样品的偏差。因此：

$$LOD = \bar{X} + 3 \times \sqrt{\frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

其中  $\bar{X}$  为重复测定零标准品的平均值， $n$  为测定次数。

## 2. 定量限（LOQ）

定量限为可以被检测到的最低浓度且灵敏度和重复性符合要求的浓度是 0.16 µg/100 g。可以通过对空白样品进行 0.16 µg/100 g 浓度加标实验证实。每个样品平行测定 10 次。10 次结果的平均值接近 0.16 µg/100 g。说明在测定定量限值 0.16 µg/100 g 时具有较好的准确性好精密度。

## （三）稳定性

### 1. 试剂盒批次稳定性

为评估本标准方法的稳定性，选择 3 个不同批次的试剂盒分别对不同浓度的饮料、糖果、调制乳粉、婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、特殊医学用途配方食品、保健食品、谷物和谷物制品、蛋、乳进行检测，用变异系数作为稳定性的评估指标。变异系数  $CV$  计算公式为： $CV(\%) = SD/\bar{X} \times 100\%$ ；其中  $SD$  为标准偏差， $\bar{X}$  为测定数据的平均值。 $SD$  为重复测定空白样品的标准偏差。

### 2. 方法稳定性

通过测定孵育温度、孵育时间、标准品和样品的加样体积的微小偏差，以考察方法的稳定性。

### 3. 准确度和精密度

以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数（ $CV$ ）作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。

我们使用了外购的美国标准化研究院 NIST 参考物质和中国检验检疫科学研究院质控样进行准确度和精密度评估。

同时项目组也采用在样品中加标回收的方法评估准确度和精密度，标准偏差、变异系数计算公式同见上节。

### 4. 与现行国家标准检测方法的比对实验

选择各种样品，同时采用本标准方法与《GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》，进行检测和数据比较分析，以检测结果的相对偏差作为性能参数的评价指标。

## 六、国内国际验证

### （一）国内室外独立验证数据

## 1. 微孔法对国标试管法检测婴幼儿乳粉中叶酸含量的偏差评定性研究

陕西省产品质量监督检验研究院采用国标方法和微孔板形式的微生物法定量检测 6 罐婴幼儿配方羊乳粉中的叶酸含量。结果表明，同一产品不同个体之间的叶酸含量存在差异，国标试管法的稳定性低于试剂盒微孔法。可在一定时间内用试剂盒微孔板法对国标试管法进行验证和偏差值评定，确保检测结果真实反映样品中叶酸含量。

## 2. 微生物法与试剂盒法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸含量的方法比较

雅培（嘉兴）营养品有限公司比较了采用国标方法和微孔法试剂盒方法测定配方乳粉质控样中叶酸的含量的区别。通过国标法和试剂盒方法各检测 10 组质控样数据，得到 20 个检测数据，从检测限和相对标准偏差对两种方法进行方法学考察。两种方法测定婴幼儿配方乳粉的叶酸的结果非常接近，实验室可以自行选择适合自己的方法。

## 3. 乳粉中维生素 B12 及叶酸的检测方法对比

山东省产品质量检验研究院和山东省标准化研究院通过分析乳粉中维生素 B12 和叶酸两个项目，运用国外试剂盒方法与国标方法进行比对，试图找出更优、更简便快捷的方法检测乳粉中两种维生素含量。实验所用上述两种方法，对同一批乳粉中的维生素 B12 和叶酸这两个项目进行检测。结果表明，无论是对于维生素 B12 还是叶酸来说，相比于国标文件中使用的传统方法，新兴的微孔板形式的微生物试剂盒法显得更胜一筹。它不仅容易操作，而且数据更精准稳定，平行性更好。

## 4. 国标微生物法与试剂盒法检测维生素胶囊叶酸含量的比对

广东省测试分析研究中心选取维生素胶囊为样品，采用叶酸国标法和试剂盒法，参考《中国药典》2015 版四部通则 9101 与文献，从叶酸含量试验结果的重复性和回收率分析比对两个方法。在本次针对维生素胶囊叶酸含量的方法比对中，从测试结果可看出，国标法和试剂盒法的重复性均良好，相对标准偏差 RSD 均 $\leq 4\%$ 。此外，在实验过程中，试剂盒法相比国标法，无需活化菌种，培养基用量少，步骤简单，污染概率低，是比较方便快捷的微生物法； 国标法从菌种活化到测吸光度值所需时间周期长，易受杂菌或杂质影响。

## （二）FAPAS 全球范围内国际实验室能力验证数据

FAPAS 是目前全球权威的实验室能力验证计划，该计划从 2007 年开始与 CNAS 互认。由英国政府食品和乡村事务部(Defra)的执行机构英国中心实验室（fera）组织。经 UKAS(United Kingdom Accreditation Service) 认可，由国际标准化组织向全球推荐（如 ISO 导则 43），已被全球食品链相关的分析实验室广泛采纳，与全球 100 多个国家的 3000 多家实验室保持密切的联系。现在中国已有超过累计超过 300 家实验室参加。据不完全统计显示，16 家国际实验室使用 VitaFast® Folic Acid 预包埋微生物法叶酸检测试剂盒分别参加六次 FAPAS 国际能力验证，结果均为满意。