

《食品中泛酸的测定 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

泛酸又名维生素 B5，也称为遍多酸，因其性质偏酸性并广泛存于多种食物中，故而得名。泛酸是由泛解酸和β-丙氨酸组成的一种化合物，分子式为 $C_9H_{17}O_5N$ 。泛酸为淡黄色粘稠状物质，溶于水和醋酸，在中性溶液中对温热、氧化及还原都比较稳定，但易被酸、碱和干热（2~6 天）破坏。常见泛酸为其钙盐，呈白色粉状晶体，微苦，可溶于水，对光及空气稳定，但在 pH 值 5~7 的水溶液遇热可被破坏。泛酸是辅酶 A（CoA）和酰基载体蛋白（ACP）生物合成的重要前体物质，参与人体中类固醇、褪黑激素、抗体和亚铁血红素的合成，是维持生命正常生理机能的必需小分子有机物，也是婴幼儿乳粉中重要的营养物质。

《GB 14880-2012 食品营养强化剂使用标准》规定，泛酸可作为食品营养强化剂用于多种食品。目前，对泛酸含量进行检测的标准方法主要包括两类，分别是微生物法和以高效液相色谱法为代表的仪器分析方法。国内泛酸含量的标准检测方法包括 2 个：《GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》中规定了各类食品中泛酸的测定方法，第一法采用微生物法，利用植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*（ATCC 8014）对泛酸的特异性和灵敏性，定量测定出泛酸的含量，一般食品称样量为 5g 时，检出限为 0.03 mg/100g，定量限为 0.06 mg/100g。营养强化剂类保健食品和配方食品称样量为 2 g 时，检出限为 0.025 mg/100g，定量限 0.05 mg/100g。第二法为高效液相法，适用于营养素补充剂类保健食品和配方食品中泛酸(钙)的测定。利用泛酸易溶于水，在弱酸性至中性条件下（pH5.0~7.0）稳定的理化性质，试样用热水在超声波振荡下提取，经 C18 反相色谱柱分离，在紫外检测器检测 200 nm 波长处检测，根据色谱峰的保留时间及紫外光谱图定性，外标法定量，计算试样中泛酸含量。当称样量为 5g 时，检出限为 0.025 mg/100g，定量限为 0.08 mg/100g。《GB/T 22246-2008 保健食品中泛酸钙的测定》规定了营养素补充剂类的保健食品中泛酸的测定方法。使用高效液相色谱对营养素类补充剂中的泛酸钙进行测定，当取样量为 1.0 g，定容至 25 mL，进样量 10 μL 时，检出限为 0.2mg/100g，定量限为 0.6 mg/100g。

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。采用液相色谱法等仪器分析方法，需要昂贵的检测仪器设备和

耗材，对实验室硬件条件要求较高，检测结果容易受到成分复杂的样品中基质背景干扰的影响，且对于含量低于仪器检出限的样品仍然需要采用微生物法进行检测。与此同时，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®Pantothenic 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*SM Program）的评估（证书号：100904）。

VitaFast®Pantothenic Acid 检测方法同样采用 GB 5009.210-2016 中规定的菌株植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*（ATCC 8014），在预包被菌种的微孔中加入培养基和梯度浓度的泛酸标准品/待测样品，可对饮料、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、片剂、胶囊、粉剂型保健食品、谷物及谷物制品、乳、蛋等多种食品进行泛酸的检测。该检测方法对食品中泛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。将植物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。

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 年开始关注食品中泛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 月开始进行食品中泛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 5413.14-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定》和《GB/T 5009.217-2008 保健食品中泛酸的测定》进行技术性能比对。基于上述工作成果，项目组 2020 年 1 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》规定泛酸可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粉（仅限儿童用乳粉）（6 mg/kg ~ 60 mg/kg）、调制乳粉（仅限孕产妇乳粉）（20 mg/kg ~ 80 mg/kg）、即食谷物，包括碾轧燕麦（片）（30 mg/kg ~ 50 mg/kg）、碳酸饮料（1.1 mg/kg ~ 2.2 mg/kg）、风味饮料（1.1 mg/kg ~ 2.2 mg/kg）、茶饮料（1.1 mg/kg ~ 2.2 mg/kg）、固体饮料类（22 mg/kg ~ 80 mg/kg）和果冻（2 mg/kg ~ 5 mg/kg）。

目前，我国涉及食品中泛酸检测的方法标准包括《GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》和《GB/T 22246-2008 保健食品中泛酸钙的测定》。

三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

AOAC 方法中，涉及泛酸含量测定的官方方法主要有 3 个：《AOAC OM 960.46 微生物法检测维生素通用性标准》、《AOAC OM 945.74 微生物法测定维生素制剂中的泛酸》、《AOAC OM 992.07 微生物比浊法测定乳基婴幼儿配方粉中的泛酸》、《AOAC OM 992.07 微生物比浊法测定乳基婴幼儿配方乳粉中的泛酸》。其中，AOAC OM 960.46、AOAC OM 945.74 和 AOAC OM 992.07 均采用微生物法进行泛酸含量的测定。

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[®] Pantothenic Acid 预包被微孔板式微生物法测定泛酸，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 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》和《GB/T 22246-2008 保健食品中泛酸钙的测定》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泛酸是植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 生长所必需的营养素，将植物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泛酸标准品或适度稀释的待测样品，置 37 °C 避光培养 20 h ~ 24 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泛酸的含量。

（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 0.04 mg/100 g。可以通过对空白样品进行 0.04 mg/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 0.04 mg/100 g。说明在测定定量限值 0.04 mg/100 g 时具有较好的准确性好精密度。

（三）稳定性

1. 试剂盒稳定性

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. 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。

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。

（四）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 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》，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

1. 烟酸和泛酸不同检测方法的对比

内蒙古蒙牛乳业集团(股份)有限公司采用两种方法对烟酸和泛酸进行测定。应用微生物方法和高效液相色谱法对同一份样品进行比较,观察相对标准偏差 RSD 和 CV 值。结果显示,两种方法的 CV 均小于 10%。说明两种方法不存在显著的差异。就样品性质而言,烟酸和泛酸均比较稳定,数据结果符合型很好。

2 微孔板式微生物法测定婴幼儿配方乳粉中的泛酸含量

黑龙江省质量监督检测研究院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。通过精密度实验、准确度实验、加标回收实验对此方法进行了评价,结果显示微孔板法精密度较好,方法稳定,且结果重现性好;使用微孔板对质控样品中泛酸含量检测结果一致,检测结果准确度较高,能满足实验室在婴幼儿配方乳粉中泛酸含量测定的应用。

3. 2 种微生物法测定婴幼儿乳粉中维生素 B5 含量的比较

广东产品质量监督检验研究院和国家酒类检测重点实验室(广东)采用微孔试剂盒法和国标法测定婴幼儿配方乳粉的维生素 B5 含量,通过相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来比对两种方法的重现性、精密度,通过加标回收实验对比方法准确度。结果显示,2 种方法的标准曲线趋势相似,但微孔试剂盒的标准曲线线性较优于国标法。从精密度与准确度实验结果看,微孔法的检测结果 RSD 处于 3.18%、加标回收率达 97.61%,重现性和准确性都略优于国标法。从实验过程比较,国标法在检测过程中需要活化菌种、耗材使用量大、操作步骤繁琐,对人员、器皿清洗的要求高。其采用的光密度法测试样品需要耗费较长的时间,检测周期长,难以实现规模性检测。而试剂盒法检测采用包被有微生物的 96 孔板,无需提前进行菌种活化,实验过程中使用耗材量少,样品的稀释过程较简单。同时,使用酶标仪对 96 孔板中样品进行读数只需几秒。极大地缩短操作步骤、检测周期。试剂盒法重现性好,准确度高,且相对于国标法而言,操作步骤简单,检验周期短,可以快速有效的测定婴幼儿乳粉中维生素 B5 的含量。