ICS 67.050
CCS X 04

团　体　标　准

T / CIFST 016—2023

食品中泛酸的测定
预包被微孔板式微生物法

Determination of pantothenic acid in foods—
pre-coated microplate microbiological method

2023-08-16　发布　　2023-08-16　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。

本文件使用了与 AOAC 官方方法 960.46 微生物法检测维生素和 GB 5009.210—2016《食品安全国家标准　食品中泛酸的测定》中一致的菌种,提取方法类似。

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:广州海关技术中心、南京海关动植物与食品检测中心、拜发分析系统销售(北京)有限公司。

本文件主要起草人:梁颖婕、刘津、高东微、龙云凤、罗奎莉、历蓉蓉、廖冰君、葛丽花、贺丽丽。

食品中泛酸的测定　预包被微孔板式微生物法

1　范围

本文件规定了食品中泛酸测定的预包被微孔板式微生物法。

本文件适用于饮料、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、谷物及其制品、蛋类和乳类食品中泛酸含量的测定。

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　原理

泛酸是预包被微孔板中植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*，ATCC 8014）生长所必需的营养素。在一定控制条件下，在泛酸测定培养基中，植物乳杆菌的生长与待测试样中泛酸的含量呈线性关系，将吸光度与标准工作曲线进行比较，即可计算出试样中泛酸的含量。

4　试剂和材料

4.1　试剂

4.1.1　预包被微孔板式泛酸微生物法试剂盒（VitaFast® Pantothenic Acid）：参见附录 A。

4.1.2　除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水要求。

4.1.3　氢氧化钠（NaOH）。

4.1.4　盐酸（HCl）。

4.1.5　高温淀粉酶（≥1.5 U/mg）。

4.1.6　一水合柠檬酸（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）。

4.2　试剂配制

4.2.1　1 mol/L 氢氧化钠：称量 4.00 g 氢氧化钠，加水溶解后，转移至 100 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。

4.2.2　1 mol/L 盐酸：量取 87.72 mL 浓盐酸，置于 1 000 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。

4.2.3　柠檬酸盐缓冲液：称取 1.50 g 一水合柠檬酸至烧杯中，加入约 50 mL 水溶解，再加入 12 mL 1 mol/L的氢氧化钠，用 1 mol/L 盐酸调整 pH 至 4.5，将溶液转入 100 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。

5　仪器和设备

5.1　水浴锅：95 ℃±1 ℃，37 ℃±1 ℃。

5.2 恒温培养箱:37 ℃±1 ℃。
5.3 均质器。
5.4 超净工作台。
5.5 离心机:≥8 000g。
5.6 酶标仪:波长 610 nm～630 nm 或 540 nm～550 nm。
5.7 涡旋混合器。
5.8 电子天平:感量 0.01 g。
5.9 微量可调单通道移液器及配套枪头:10 μL～100 μL、50 μL～200 μL、100 μL～1 000 μL。
5.10 无菌离心管:1.5 mL～2 mL、15 mL、50 mL。
5.11 锥形瓶:500 mL。
5.12 容量瓶:100 mL 和 1 000 mL。
5.13 无菌注射器:10 mL。
5.14 无菌聚醚砜滤膜(PES):0.22 μm。

6 分析步骤

6.1 试样制备

固体试样需粉碎、研磨、过筛(筛板孔径 0.3 mm～0.5 mm);半固体试样需混匀;液体试样需振摇混合。

6.2 试样提取

6.2.1 饮料

准确称量 1.00 g 固体试样或移取 1 mL 液体试样至 50 mL 无菌离心管中,加水至 40 mL,涡旋混匀后,试样溶液用无菌注射器和无菌聚醚砜滤膜无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 的样品液。

6.2.2 糖果

准确称量 1.00 g 试样至 50 mL 无菌离心管中,加水至 40 mL,涡旋混匀后,置于 95 ℃水浴 30 min,使试样溶解,其间颠倒混匀至少 5 次,并确保离心管紧闭。水浴结束后,置于冰浴迅速冷却到 30 ℃以下,试样溶液用无菌注射器和无菌聚醚砜滤膜无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 的样品液。

6.2.3 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

准确称量 1.00 g 试样至 50 mL 无菌离心管中,加水至 40 mL,涡旋混匀后,置于 95 ℃水浴 30 min,其间颠倒混匀至少 5 次,并确保离心管紧闭。水浴结束后,置于冰浴迅速冷却到 30 ℃以下,试样溶液用无菌注射器和无菌聚醚砜滤膜无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 的样品液。

6.2.4 保健食品

准确称量 1.00 g 试样,置于 500 mL 锥形瓶,加入 400 mL 水,混合均匀后,置于 95 ℃水浴 30 min,其间摇匀至少 5 次,水浴结束后,置于冰浴迅速冷却到 30 ℃以下。将全部溶液转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。取 1 mL 溶液至 50 mL 无菌离心管中,加水至 40 mL,涡旋混匀,试样溶液用无菌注射器和无菌聚醚砜滤膜无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 000 的样品液。若泛酸含量较低,可适当调整定容体积。

6.2.5 谷物及其制品、蛋类和乳类食品

准确称量 1.00 g 试样至 50 mL 无菌离心管中,加入 20 mL 按 4.2.3 配制的柠檬酸盐缓冲液,加入

300 mg 高温淀粉酶，在 37 ℃黑暗条件下孵育 1 h(其间不时振荡)。加水至 40 mL。在 95 ℃水浴中提取 30 min，其间颠倒振荡至少 5 次，并确保离心管紧闭。水浴结束后，置于冰浴迅速冷却至 30 ℃以下。室温(20 ℃～25 ℃)条件下 8 000*g* 离心 5 min，取上清液。此为稀释倍数为 40 的样品液。

6.3 样品液稀释

按照试样的泛酸标签值及标准曲线范围，用无菌蒸馏水(见附录 A.1)对样品液进行适当稀释，使稀释后样品液的泛酸含量落在标准曲线范围内。样品液稀释时应逐级稀释，注意每次稀释倍数不应大于 10。

6.4 培养基制备

用 10 mL 无菌蒸馏水(见附录 A.1)溶解测定泛酸的干粉培养基(见附录 A.1)，盖紧瓶盖，涡旋振荡混匀，置于 95 ℃水浴 5 min，其间颠倒混匀至少 2 次。水浴结束后，置于冰浴迅速冷却到 30 ℃以下。用无菌注射器和无菌聚醚砜滤膜对培养基溶液无菌过滤，置于 15 mL 无菌离心管待用，现用现配。

6.5 标准稀释工作液的配制

根据标准品的标签说明，在标准品中加入相应体积的无菌蒸馏水(见附录 A.1)，涡旋混匀得到 0.4 mg/100 mL 标准品浓缩液。根据表 1 进行梯度标准稀释工作液的配制，现用现配。

表 1 梯度标准稀释工作液的配制

编号	浓度/(mg/100 mL)	配制方法
标准稀释工作液 0(Std 0)	0	900 μL 无菌蒸馏水＋0 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 1(Std 1)	0.04	900 μL 无菌蒸馏水＋100 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 2(Std 2)	0.08	400 μL 无菌蒸馏水＋100 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 3(Std 3)	0.12	350 μL 无菌蒸馏水＋150 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 4(Std 4)	0.16	300 μL 无菌蒸馏水＋200 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 5(Std 5)	0.24	200 μL 无菌蒸馏水＋300 μL 标准品浓缩液

6.6 加样和培养

6.6.1 加样

每个标准稀释工作液和待测样品都设置三平行，取出所需数量的微孔板条并在微孔板架上固定，未使用的微孔板条立即放回原来的箔袋中，并与干燥剂一起重新封好，储存在 2 ℃～8 ℃温度条件下。吸取 150 μL 无菌过滤后的泛酸培养基至每个微孔中。吸取 150 μL 标准稀释工作液或待测样品液至微孔中，记录每个微孔所加的标准品或待测样品的编号。根据使用微孔板条的数量，取出合适大小的黏合箔，去除黏合箔的保护膜后平放在微孔条上，用手将黏合箔压平，使其充分封闭微孔，确保边缘部分压平/密封。

6.6.2 培养

将密封好的微孔板置于 37 ℃避光孵育 20 h～24 h。

6.6.3 测定

将微孔板倒置于桌面并紧贴桌面平行摇动，使微孔中的液体混匀。将微孔板翻转孔口朝上静置 10 s 后，以对角线方向缓慢撕下黏合箔，撕下黏合箔时应注意用手按住微孔板条边缘防止因黏合箔带动微

孔条而造成微孔中液体溅出。撕下黏合箔后仔细检查微孔中的液体，如有气泡应用移液器枪头戳破或用移液器吸除。用酶标仪于 610 nm～630 nm 或 540 nm～550 nm 波长下读取吸光度。

7 绘制标准曲线、结果计算和结果表述

7.1 绘制标准曲线

计算梯度标准稀释工作液的三平行检测所测得的吸光度的算术平均值，结果保留三位有效数字。以梯度标准品泛酸钙含量做横坐标，以吸光度的平均值为纵坐标，使用 RIDASOFT® Win 软件的四参数法绘制标准曲线。

注：使用 RIDASOFT® Win 软件中对应本方法的分析程序，可得到泛酸钙的检测结果以及对应的已考虑换算系数 0.92 的泛酸检测结果，无需再次换算。

7.2 结果计算

计算待测样品液的三平行检测所测得的吸光度的算术平均值，结果保留三位有效数字。在标准曲线中代入待测样品液吸光度的平均值，求得待测样品液中泛酸钙的浓度。按照式(1)或式(2)求得待测样品中泛酸的含量。

固体和半固体试样中泛酸的含量为：

$$X = \frac{C_x}{m \times 40} \times d \times V \times 0.92 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X ——待测样品中泛酸的含量，单位为毫克每百克(mg/100 g)；

C_x ——待测样品液中泛酸钙的浓度，单位为毫克每百毫升(mg/100 mL)；

m ——待测样品的质量，单位为克(g)；

40 ——稀释倍数 40，已经包括在标准曲线中；

d ——样品液的稀释倍数；

V ——定容体积，40 mL；

0.92 ——泛酸与泛酸钙的换算系数。

液体试样中泛酸的含量为：

$$X = \frac{C_x}{v \times 40} \times d \times V \times 0.92 \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X ——待测样品中泛酸的含量，单位为毫克每百毫升(mg/100 mL)；

C_x ——待测样品液中泛酸钙的浓度，单位为毫克每百毫升(mg/100 mL)；

v ——待测样品的体积，单位为毫升(mL)；

40 ——稀释倍数 40，已经包括在标准曲线中；

d ——样品液的稀释倍数；

V ——定容体积，40 mL；

0.92 ——泛酸与泛酸钙的换算系数。

注 1：根据 6.2 制备样品液时的 40 倍稀释倍数已经包括在标准曲线中，稀释倍数 d 只需考虑除 40 倍以外的稀释倍数，例如 6.2.4 中额外的 1 000 倍，或 6.3 中的稀释倍数。

注 2：测定结果保留小数点后两位有效数字。

7.3 结果表述

7.3.1 若测定的是固体样品，泛酸含量用 mg/100 g 表示；若测定的是液体样品，泛酸含量用 mg/100 mL

表示。

7.3.2　若测定结果小于定量限 0.04 mg/100 g(mL),则待测样品中泛酸含量测定结果表述为“< 方法定量限”。

8　质量控制

8.1　标准稀释工作液 0 的吸光度应小于标准稀释工作液 1 的吸光度,标准稀释工作液 5 的吸光度应大于 0.6,否则表明实验失败。

8.2　标准曲线的相关系数不得低于 0.99。

8.3　3 组平行的变异系数不应大于 10%。

8.4　当待测样品液的吸光度小于标准稀释工作液 1 或大于标准稀释工作液 5 的吸光度时,不能使用标准曲线求得待测样品中泛酸的含量,需调整稀释倍数重新检测,使待测样品液的吸光度落在标准曲线的定量范围内。

8.5　不同批号试剂盒中的组分不得混用,超过有效期的试剂盒不得使用。

9　灵敏度

本方法检测饮料、糖果、调制乳粉的检出限为 0.003 7 mg/100 g(mL),定量限为 0.04 mg/100 g(mL);
检测婴幼儿配方食品的检出限为 0.003 6 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测婴幼儿辅助食品的检出限为 0.003 1 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测特殊医学用途配方食品的检出限为 0.004 2 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测保健食品的检出限为 0.003 3 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测谷物的检出限为 0.003 6 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测谷物制品的检出限为 0.003 3 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测蛋类食品的检出限为 0.003 4 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g;
检测乳类食品的检出限为 0.003 3 mg/100 g,定量限为 0.04 mg/100 g。

附　录　A
（规范性）
预包被微孔板式泛酸微生物法检测试剂盒

A.1　试剂盒组成

预包被微孔板式泛酸微生物法检测试剂盒 VitaFast® Pantothenic Acid 包括：

a）包被有菌种 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 的微孔板：12×8 孔；

b）无菌蒸馏水：30 mL/瓶×3 瓶；

c）泛酸钙标准品（固态）：3 瓶；

d）泛酸测定培养基（干粉）：3 瓶；

e）黏合箔：3 片；

f）微孔板架：1 个。

A.2　试剂盒验收和保存

A.2.1　每个批号试剂盒应进行验收试验，验收需符合质量控制要求。

A.2.2　试剂盒于 2 ℃～8 ℃暗处避光保存，使用前回复至室温，使用后立即放回保存条件下。

A.3　标准曲线谱图示例

标准曲线谱图示例见图 A.1。

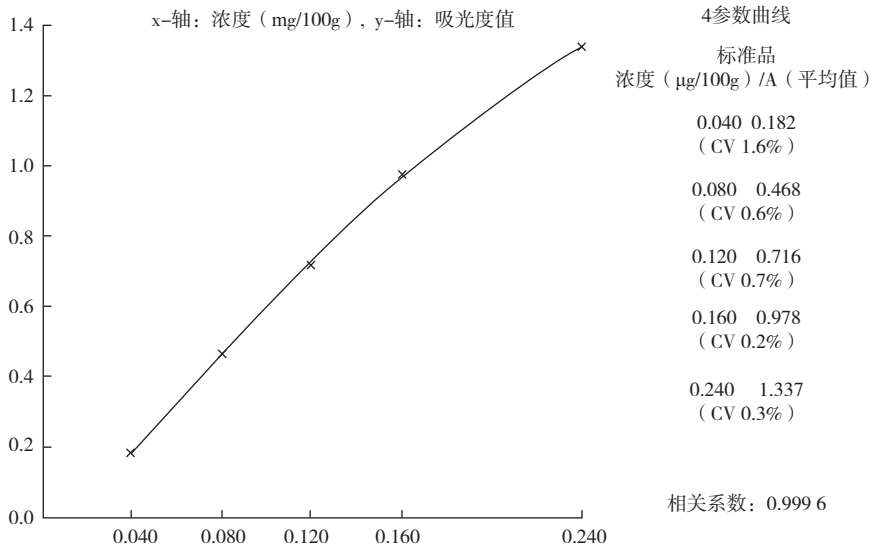

图 A.1　标准曲线谱图示例