

综述

国内外检测食品中叶酸标准的对比及建议

孟静^{1,2}, 王锐³, 霍胜楠^{1,2}, 伊廷存^{1,2}, 孙潇慧^{1,2}, 程祥龙^{1,2}, 胡梅^{1,2}

(1. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101; 2. 山东省特殊医学用途配方食品质量工程技术研究中心, 山东 济南 250101; 3. 山东第一医科大学化学与制药工程学院, 山东 泰安 271016)

摘要:美国官方分析化学家协会的叶酸检测标准可选择性多,如使用的菌株、培养温度等,使用仪器较为先进。我国标准在这些方面还存在一定的差距。本文收集中国、国际食品法典委员会、欧盟和美国组织制定的有关叶酸检测的标准,从适用范围、菌株、样品的前处理、培养、测定等过程分别进行对比。标准的制修订过程中,建议对比借鉴国际标准的制修订和验证流程,逐步与国际标准化体系建设接轨,实施标准跟踪和培训,满足实验室检测需要。

关键词:叶酸; 食品安全标准; 国内外标准对比

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2023)01-0148-03

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.01.023

Comparison and suggestion on the determination of folate in food between domestic and international standards

MENG Jing^{1,2}, WANG Rui³, HUO Shengnan^{1,2}, YI Tingcun^{1,2}, SUN Xiaohui^{1,2},
CHENG Xianglong^{1,2}, HU Mei^{1,2}

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Ji'nan 250101, China; 2. Shandong Research Center of Engineering and Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Shandong Ji'nan 250101, China; 3. Shandong Academy of Medical Science, Shandong First Medical University, Shandong Taian 271016, China)

Abstract: Association of Official Analytical Chemists standard for the determination of folate is more flexible, such as the use of strains, culture temperature, the use of more advanced equipment. There are still some gaps in these aspects in domestic standards. The relevant standards and regulations of the determination of folate in China, Codex Alimentarius Commission, European Union and the United States are compared from the aspects of the scope of application, strain, sample pretreatment, culture, determination method and others. In the process of drafting and revising the standards, the international standard system should be referenced and integrated gradually, standard review and training should be implemented to meet the needs of the lab.

Key words: Folate; food safety standard; comparison between domestic and international standards

叶酸是一类结构相似的化合物,属于水溶性维生素,是生命活动中不可缺少的一种微量化合物^[1]。本文针对食品中叶酸测定方法,对比分析了国内外叶酸检测方法标准异同,以期为叶酸检测相关实验人员提供控制实验操作过程、对相关规定的理解以及质量控制的有效知识和信息,为我国标准的制修订工作提供思路和参考。

1 国内外叶酸检测标准现状

1943年O'DELL等^[2]最早提出生物法测定叶

酸的技术。生物法最早采用动物作为实验对象,后来发现在大鼠肠道中存在能够合成叶酸的微生物,干扰叶酸含量的测定^[3-4]。由于微生物结构简单,因此开发了以微生物为载体的叶酸测定方法,目前筛选到的微生物主要有细菌、酵母和霉菌^[5]。

国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)、欧盟和美国叶酸检测方法标准主要依据美国官方分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)组织发布的标准,采用自愿化标准体系,不具有强制性,标准的制订和修订由各国的专业团体、协会和学会承担。目前AOAC共发布7个标准,分别为BS EN 14131—2003^[6]、AOAC 2004.05—2014^[7]、AOAC 992.05—

收稿日期: 2021-12-30

作者简介: 孟静 女 高级工程师 研究方向为食品微生物检测

E-mail: mengjing201@163.com

1995^[8]、AOAC 944.12—1997^[9]、AOAC 960.46—1960^[10]、AOAC 2011.05—2011^[11]和 AOAC 2011.06^[12],其中前5个为微生物方法。AOAC 2011.05—2011是光学生物传感器法,2011年 HARVEY INDYK 提出了利用光学生物传感器法来测定叶酸,该方法被列入 AOAC 的推荐方法。AOAC 2011.06 是超高效液相色谱-质谱/质谱法,在样品经过酶解、提取等步骤后,通过超高效液相色谱-质谱进行分析,但该方法仅可对单一组分进行测定,得到的是样品中某种叶酸单体的含量。

我国目前对食品中叶酸的检测方法标准为 GB 5009.211—2014,为强制标准,该标准为微生物法,使用标准菌株为鼠李糖乳杆菌(ATCC 7469),在一定的叶酸浓度范围内,固定条件(温度、时间等)下培养后,根据菌悬液浓度来反映产品中对应叶酸的含量。

2 国内外叶酸检测标准中微生物法的对比

由于微生物法具有高灵敏度、能检测活性叶酸盐等特点,AOAC 将微生物法作为叶酸检测的首选方法和仲裁方法,本文主要针对我国和 AOAC 标准中微生物法的适用范围、使用的菌株及保存方式、样品前处理和培养测定条件等方面进行对比。

2.1 适用范围

GB 5009.211—2014 和 BS EN 14131—2003 均适用于食品中叶酸的测定,包括叶酸强化食品如婴幼儿配方乳粉,也包括天然食品如菠菜、猪肝等,测定的是食品中总的叶酸含量。AOAC 2004.05—2014 适用于谷物和谷类食物中的总叶酸的测定;AOAC 992.05—1995 适用于婴幼儿配方乳粉中游离态叶酸的测定;AOAC 944.12—1997 只适用于含有游离叶酸的维生素制剂;AOAC 960.46—1960 是微生物法测定叶酸、生物素、泛酸等水溶性维生素的方法总则。以上标准的适用范围取决于样品前处理阶段是否使用酶解来释放样品中的结合态叶酸盐。

2.2 使用的菌株及保存方式

我国与 AOAC 叶酸检测标准在菌株选择上不同,GB 5009.211—2014 和 BS EN 14131—2003、AOAC 2004.05—2014、AOAC 992.05—1995 中所使用的菌株为鼠李糖乳杆菌,该菌株用于测定含谷氨酰基 ≤ 3 个的叶酸盐^[13],而 AOAC 944.12—1997、AOAC 960.46—1960 中测定使用的菌株为粪链球菌。这两株菌都对叶酸有生长特异性,可用于叶酸测定。

我国与 AOAC 标准对菌株活性的保存方式也不同,GB 5009.211—2014 中对储备菌株规定了每月传代1次,接种液则采用了“叶酸饥饿”培养的菌

悬液;BS EN 14131—2003、AOAC 2004.05—2014 采用-20℃或-70℃保存储备菌株,与无菌生理盐水混合后作为工作菌株使用;AOAC 992.05—1995、AOAC 944.12—1997 中采用了月、周和日接种管对菌株进行传代,日接种管接种肉汤培养后,对沉淀物离心洗涤,重悬后作为接种液。从实际检验工作来看,传统的琼脂传代保存或饥饿培养方法都比较繁琐,易引起菌株的污染、变异。冷冻保存菌株直接使用的方式较为简单方便,制备后可长期使用,在保持活性的基础上降低了实验人员的工作量。

2.3 样品前处理

GB 5009.211—2014 中样品前处理分为酶解提取法和直接提取法。酶解提取法是采用鸡胰腺冻干粉、蛋白酶和淀粉酶来处理谷薯类、肉蛋类等含天然叶酸的样品;对于营养补充剂或外源添加叶酸的测定可使用直接提取法。BS EN 14131—2003 中样品经过 100℃~121℃处理,采用 γ -谷氨酰水解酶(猪胰腺来源)水解3h后,得到的上清液可在-18℃保存;AOAC 2004.05—2014 中对样品进行高压、鸡胰腺冻干粉、蛋白酶和淀粉酶处理后,滤液可在4℃放置过夜;AOAC 992.05—1995 使用鸡胰腺冻干粉水解样品;AOAC 944.12—1997 用碱性溶液溶解后高压水解,冷却过滤作为待测液。样品前处理过程是否采用酶解处理主要由样品中是否含天然叶酸及所占比例决定。

2.4 培养、测定仪器

在营养元素固定的条件下,温度和时间是微生物培养条件的主要影响因素。通过对比国内外标准中的培养条件(表1)可知,叶酸测定标准中规定:鼠李糖乳杆菌的生长温度为30℃~40℃,粪链球菌为37℃。

表1 菌株培养条件及测定仪器

标准	培养条件	测定仪器
GB 5009.211—2014	(37±1.0)℃, 20~40 h	
AOAC 944.12—1997	30~40℃, ±0.5℃, 6~24 h	分光光度计
AOAC 960.46—1960	30~40℃, ±0.5℃	
BS EN 14131—2003	(37±0.2)℃, 15~24 h	分光光度计、酶标仪
AOAC 2004.05—2014	37℃, 22 h	
AOAC 992.05—1995	37℃, 24 h(光密度法); 28~40℃, ±0.5℃, 60~72 h(酸度法)	分光光度计、酸度计

我国使用的检测仪器是分光光度计,国外使用的是分光光度计、酶标仪。一般来说,培养后的菌悬液测定方式分为光密度测定和酸度测定,可使用

仪器有分光光度计、酶标仪、pH计。分光光度计、pH计在测定过程中需要耗费大量的人力物力,工作量大,重复性和稳定性较差,工作效率低。酶标仪测定使用的是微孔板,通量大,样本、试剂用量少,具有检测速度快的显著优势,在吸光度值的测定中,已发展成为适用范围广的分析仪器^[14]。

2.5 其他

BS EN 14131—2003标准中规定了重复性限和重现性限。以乳粉为例,叶酸平均含量为142 μg/100 g,重复性限为26 μg/100 g,重现性限为67 μg/100 g; AOAC 992.05—1995乳粉中叶酸平均含量为173.1 μg/100 g时,重复性限为16.2 μg/100 g,重现性限为44 μg/100 g;我国标准GB/T 27404—2008给出了实验室的变异系数参考值^[15],目标物含量为1 mg/kg时为11%,而GB 5009.211—2014中对强化食品规定的重复性限为平均值的5%,该标准规定得较为严格,但实验影响因素较多,不能完全满足该要求。

3 我国食品安全国家标准的修订建议

通过国内外标准对比可以看出, AOAC的标准在叶酸的测定过程可选择性多,使用仪器较为先进。我国与国外标准相比,在菌株、培养温度、测定仪器的可使用性等方面,仍存在一些差距,这是由于发达国家的实验室拥有先进的仪器设备,检验检测机构专业人员水平较高,而我国实验室检测设备较发达国家还有差距,食品检测人员的专业技术水平满足不了食品检测需求,例如分光光度计已不能满足日常检测要求,菌株的保存条件、储备溶液的标定等问题,在检测过程中都对实验效率、准确性和重复性存在一定的影响,因此GB 5009.211—2014亟待修订。

GB 5009.211—2014修订过程中,在储备菌株是否能保存30代、叶酸储备液是否需要标定、饮料是否可用直接提取法等方面收到的意见反馈较多。通过对比国内外标准的差异,参考国际标准,采纳部分意见建议,扩大了GB 5009.211—2014检测过程中的可选择性。同时,GB 5009.211—2014修订时,还应当对比借鉴国际标准的制订、修订和验证流程,逐步与国际标准化体系建设接轨,满足实验室检测需要。在标准发布后,对标准中的关键点及修订内容,加强宣贯培训,提高实验室检验水平和质量,确保检验检测结果的准确性和有效性。

本文通过对比国内外叶酸检测标准,掌握叶酸检测方法的发展现状,评估国内外标准检测的差异性,借鉴国外标准中的优势,吸纳先进的检测手段,

促进了叶酸标准修订的时效性。

参考文献

- [1] HAIDEN N, KLEBERMASS K, CARDONA F, et al. A randomized, controlled trial of the effects of adding vitamin B₁₂ and folate to erythropoietin for the treatment of anemia of prematurity [J]. *Pediatrics*, 2006, 118(1): 180-188.
- [2] O'DELL B L, HOGAN A G. Additional observations on the chick antianemia vitamin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1943, 149(2): 323-337.
- [3] HERBERT V, BERTINO J R. Folic acid: The vitamin [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1967: 243.
- [4] DAY P L, TOTTER J R. The bioassay of the vitamin M group [J]. *Biological Symposium*, 1947, 12: 313.
- [5] BIRD O D, MCGLOHON V M. Differential assays of folic acid in animal tissues [M]. *Analytical Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 1972: 409-437.
- [6] British Standards Institution. Foodstuffs. Determination of folate by microbiological assay: BS EN 14131—2003 [S]. British Standards, 2003.
- [7] AOAC. Total folates in cereals and cereal foods microbiological assay-Trienzyme procedure: AOAC 2004.05—2004 [S]. AOAC, 2004.
- [8] AOAC. Official Total folate (pteroylglutamic acid) in infant formula micro biological methods: AOAC 992.05—1995 [S]. AOAC, 1995.
- [9] AOAC. Folate in vitamin preparations microbiological methods: AOAC 944.12—1997 [S]. AOAC, 1997.
- [10] AOAC. Microbiological methods: AOAC 960.46—1960 [S]. AOAC, 1960.
- [11] AOAC. Folate in infant formula and adult/Pediatric nutritional formula. Optical biosensor assay: AOAC 2011.05—2011 [S]. AOAC, 2011.
- [12] AOAC. Total folates in infant formula and adult nutritionals trienzyme extraction and UPLC-MS/MS quantitation: AOAC 2011.06—2011 [S]. AOAC, 2011.
- [13] GUNTER E W, BOWMAN B A, CAUDILL S P, et al. Results of an international round robin for serum and whole-blood folate [J]. *Clinical Chemistry*, 1996, 42(10): 1689-1694.
- [14] 龙慧玲, 杨举豪, 彭建, 等. 家蝇天蚕素抗菌肽 Cec4 对鲍曼不动杆菌抑菌活性的研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(12): 891-896.
LONG H L, YANG J H, PENG J, et al. Antimicrobial activity of musca domestica cecropin-4 (mdCec 4) against *Acinetobacter baumannii* [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2017, 37(12): 891-896.
- [15] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化委员会. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Criterion on quality control of laboratories - Chemical testing of food: GB/T 27404—2008 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.