

牛奶中泛酸含量测定

刘志楠, 喻东威, 赵源, 刘晓川, 赵雅丽, 李梅, 薛志清, 杜丽
(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司质量管理体系分析中心, 内蒙古 呼和浩特 011500)

摘要: 目的: 对牛奶中泛酸的本底含量进行测定, 为乳制品中泛酸的强化提供数据支持。方法: 选取大量牛奶样本, 通过微生物法和高效液相色谱法对泛酸含量进行测定。结果: 牛奶中的泛酸含量大约为 253~502 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, 平均值为 365.9 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ 。结论: 乳制品中强化泛酸可以依据上述数值参考添加。

关键词: 牛奶; 微生物法; 高效液相色谱法; 泛酸

Determination of Pantothenic Acid Content in Milk

LIU Zhi-nan, YU Dong-wei, ZHAO Yuan, LIU Xiao-chuan, ZHAO Ya-li, LI Mei, XUE Zhi-qing, DU Li
(Analysis Test Center, Quality Management Department, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industry (Group) Limited Company, Huhhot 011500, China)

Abstract: Purpose: To determine pantothenic acid content in milk so as to provide data supports for fortifying milk with pantothenic acid. Methods: Large samples of milk were collected and determined for their pantothenic acid content by the microbiological method and HPLC, respectively. Results: The content of pantothenic acid in milk was approximately between 253 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ and 502 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ with an average of 365.9 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Conclusion: This study can provide useful references for pantothenic acid fortification of milk.

Key words: milk; microbiological method; high performance liquid chromatography; pantothenic acid

中图分类号: Q563.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)02-0177-04

泛酸又称 VB₅, 是牛奶中天然含有的水溶性 B 族维生素, 因其分布广泛而得名。泛酸于 1933 年从酵母中首次分离^[1], 在酸性溶液中易分解, 在中性溶液中较为稳定^[2]。泛酸是辅酶 A 的组成成分, 参与体内碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢, 特别是对脂肪的合成与代谢起着十分重要的作用^[3]。据报道, 泛酸可延长全饥饿小鼠饥饿耐受时间^[4]和果蝇热环境生存时间^[5], 对于猪和禽类的繁殖与生产能力亦有明显促进作用^[6-7], 还可促进红枣离体快速育苗^[8]。

关于泛酸的检测, 以往文献报道的方法主要包括微生物、高效液相法、酶法和免疫法等^[9-10], 但国内文献对牛奶中泛酸本底含量的相关报道却很少。针对这种现象, 本实验选取 526 份中国各地的牛奶样本, 依据国标 (GB 5413.17—2010 《食品安全国家标准: 婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定》) 的方法, 采用高效液相色谱法和微生物法对牛奶中的泛酸进行检测, 意在得出牛奶中泛酸含量的大致范围, 以指导乳制品企业在合理范围内强化泛酸的添加量。本研究参考 AOAC^[11]的方法, 并使用泛酸检测试剂盒^[12]使微生物检测泛酸的方法有较大

程度的优化, 使检测时间有较大幅度的缩短。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

植物乳酸杆菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)。泛酸检测试剂盒 德国 Ifp 公司; 淀粉酶(酶活力 $\geq 1.5\text{U}/\text{mg}$); 甲醇(色谱纯); 盐酸; 硫酸锌; 盐酸(0.1mol/L); 硫酸锌溶液(15g/100mL); 磷酸二氢钾溶液(0.05mol/L); 泛酸标准储备液(1mg/mL, 泛酸浓度=泛酸钙浓度 $\times 0.920$); 泛酸标准中间液(0.1mg/mL, 临用前配制)。

电子天平(感量 0.1mg); 高效液相色谱仪(带紫外检测器); 超声波; pH 计(精度 0.01); 培养箱(55 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$); 酶标仪(630nm); 超净台; 微量可调移液器(100~1000、20~200 μL); 一次性无菌滤膜(0.2~0.22 μm); 5mL 一次性无菌注射器; 15mL 无菌离心管; 1.5~2.0mL 无菌离心管。

1.2 方法

1.2.1 方法概述

收稿日期: 2011-02-09

作者简介: 刘志楠(1982—), 男, 分析研究员, 硕士, 研究方向为食品检测与分析。E-mail: lznzy1@126.com

微生物培养法: 某些菌体生长对某种特定维生素具有较强的依赖性。配制选择性的培养基, 即含有菌体生长除待测维生素以外的所有营养元素。待测维生素添加的多少直接影响菌体的生长情况。通过添加不同浓度的待检测维生素作为标注曲线, 就可以半定量判定样品中的特定维生素的含量, 最后通过细菌生长的浊度显示出来。

高效液相色谱法: 试样经热水提取等前处理后, 经 C_{18} 色谱柱分离, 紫外检测器检测, 外标法定量泛酸的含量。

1.2.2 样品前处理

微生物法: 取 1mL 样品至 50mL 离心管中, 准确加入双蒸水 39mL, 旋涡混匀。在超净台中用 $0.2\sim 0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤至 $1.5\sim 2.0\text{mL}$ 无菌离心管中。

高效液相色谱法: 称取混合均匀的固态试样约 5g (精确至 0.0001g) 或液态试样约 20g (精确至 0.0001g) 于 150mL 三角瓶中, 固体试样加入约 30mL $40\sim 50^\circ\text{C}$ 水, 振摇溶解后超声萃取 20min。

1.2.3 培养基的制备

加入 10mL 无菌水至维生素培养基中, 盖好瓶盖, 摇匀。在 $90\sim 100^\circ\text{C}$ 水浴中加热 5min 以上, 其间振荡至少 2 次, 迅速冷却至室温 (低于 30°C)。使用 $0.2\sim 0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤培养基至 15mL 无菌离心管中。

1.2.4 测定液的制备

试样溶液降至室温后, 用盐酸 (10.5) 调节 pH (4.5 ± 0.1), 加入 5mL 硫酸锌溶液, 充分混合。转入 50mL 容量瓶中, 用水定容至刻度并充分混匀后, 用滤纸过滤。滤液经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 即为试样待测液。

1.2.5 参考色谱条件

色谱柱: ODS- C_{18} (粒径 $5\mu\text{m}$, $250\text{mm}\times 4.6\text{mm}$) 或具有同等性能的色谱柱; 流动相: 取磷酸二氢钾溶液 900mL, 取甲醇 100mL, 混匀后经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜; 加压过滤; 流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$; 测定波长 200nm ; 柱温 $(30\pm 1)^\circ\text{C}$; 进样量 $10\mu\text{L}$ 。

1.2.6 标准品的配制

微生物法: 泛酸标准品用无菌水配制成不同的质量浓度梯度 (0 、 40 、 80 、 120 、 160 、 $240\mu\text{g}/100\text{mL}$), 以无菌双蒸水为参比, 在 630nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标、标准品质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得到标准曲线方程。

高效液相色谱法: 分别准确吸取泛酸标准中间液 1.0 、 2.0 、 4.0 、 8.0 、 12.0mL 于 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 得到质量浓度分别为 1.0 、 2.0 、 4.0 、 8.0 、 $12.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 的泛酸标准工作液, 临用前配制。

将上述泛酸标准工作依次进行色谱测定, 记录色

峰高 (或峰面积)。以峰高 (或峰面积) 为纵坐标、标准工作液质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程。

1.2.7 试样溶液的测定

吸取试样待测液 $10\mu\text{L}$, 将试样待测液进行色谱测定, 从标准曲线中查得试液中泛酸的质量浓度。

1.2.8 检测步骤

将菌体包被于微孔中, 取出需要数量的微孔板条并在板上固定, 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 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下; 用移液器吸取 $150\mu\text{L}$ 待测维生素培养基至微孔中; 用移液器吸取 $150\mu\text{L}$ 标准品或样品至指定的微孔中; 用粘合箔盖住微孔条或微孔; 在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 黑暗条件下孵育 $20\sim 24\text{h}$ 。

1.2.9 测量及计算

将微孔板旋涡混匀, 用酶标仪于波长 630nm 条件下读取浊度。使用维生素专用软件进行计算 (4P 法)。

2 结果与分析

2.1 泛酸标准曲线方程和色谱图

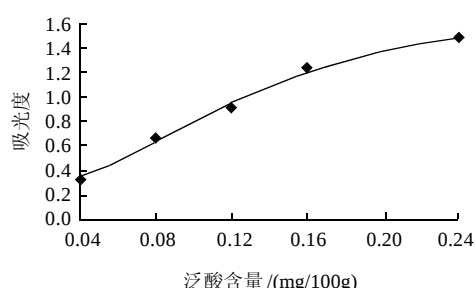


图 1 微生物法测定泛酸的标准曲线

Fig.1 Standard curve of pantothenic acid determined by microbiological method

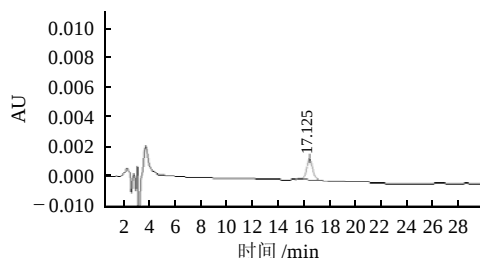


图 2 泛酸标准品的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of pantothenic acid standard

由图 1 可知, 泛酸 4 参数标准曲线相关系数为 0.9993 , 效果较好; 由图 2 可知, 高效液相色谱法标准品峰值和峰形较好; 说明检测数据可信度很高, 可以用于实际样品的分析研究。

表2 泛酸回收率实验的测定结果

Table 2 Recovery rates of pantothenic acid in 20 milk samples determined by microbiological method

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
回收率/%	85.6	96.3	102.5	85.4	105.4	93.8	90.6	88.6	97.6	103.5	103.4	110.0	98.5	97.6	95.9	87.6	82.6	84.1	80.6	99.2

表3 泛酸相对标准偏差的考察结果

Table 3 Precision (RSD) of microbiological method

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
相对标准偏差/%	8.3	7.6	5.1	4.9	9.7	8.6	7.5	6.6	8.1	2.2	4.8	6.9	7.6	6.9	2.1	5.4	10.0	3.7	9.9	3.7

2.2 不同方法检测泛酸数据对比情况

选取10组样本进行对比试验,微生物法和高效液相色谱法检测牛奶中泛酸的标准差、相对标准偏差和变异系数值的统计结果见表1。

表1 不同方法检测泛酸的实验结果

Table 1 Pantothenic acid content determined by different methods

试验号	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)		标准差/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对标准 偏差/%	变异系 数/%
	微生物法	高效液相色谱法			
1	380	367	9	0.025	2.5
2	390	360	21	0.057	2.7
3	405	407	1	0.003	0.3
4	470	450	14	0.031	3.1
5	368	352	11	0.031	3.1
6	420	440	14	0.033	3.3
7	420	436	11	0.026	2.6
8	450	459	6	0.014	1.4
9	380	403	16	0.042	4.2
10	390	385	4	0.009	0.9

表1结果显示,微生物法和高效液相色谱法检测牛奶中泛酸数值的CV值都在10%的范围内,相当于国标要求的检测两个平行样品之间的数值要求范围,可见两种方法的结果是一致的,因此可以采用一种方法(微生物法)进行大量样本的检测。

2.3 泛酸回收率的测定

选取的20组样本作回收率抽样统计,结果见表2。微生物法回收率在80.6%~110.0%之间,检测的结果符合回收率的要求。

2.4 泛酸相对标准偏差的考察

选取20组样本,同一样品做平行样检测,相对标准偏差抽样统计结果见表3。微生物法检测相对误差在2.1%~10.0%之间,检测的结果较好。

2.5 实际样品中的泛酸测定

由图3可知,526组泛酸数据平均值为 $365.9\mu\text{g}/100\text{mL}$,数据范围为 $253.0\sim 502.0\mu\text{g}/100\text{mL}$,牛奶中泛

酸含量大部分在 $300\sim 450\mu\text{g}/100\text{mL}$ 之间,在 $350\mu\text{g}/100\text{mL}$ 附近分布最多。

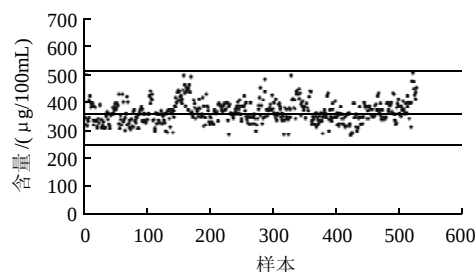


图3 实际样品中的泛酸测定结果分布

Fig. 3 Pantothenic acid content distribution of actual samples

3 讨论

实验结果显示,微生物法和高效液相色谱法的检测结果一致。对微生物法检测泛酸的标准曲线相关系数、回收率和相对标准偏差进行统计,检测结果都很好,高效液相色谱法因其检测速度较慢、成本较高,所以采用微生物法进行大量样本的测定。

微生物法对526组牛奶样本进行统计分析结果显示,泛酸平均值为 $365.9\mu\text{g}/100\text{mL}$,数据范围在 $253.0\sim 502.0\mu\text{g}/100\text{mL}$ 之间。牛奶中泛酸含量大部分在 $300\sim 450\mu\text{g}/100\text{mL}$ 之间,数据在 $350\mu\text{g}/100\text{mL}$ 附近分布最广。

为了评价食品标签上标注成分的准确性。美国食品和药物管理局FDA规定维生素在食品中的实际添加量必须为标签上标注量的100%或更多,而原生维生素产品中的维生素含量必须为标签上标注量的80%或更多。European Directive 2002/46/EC也制定了一系列法规,用于检测添加过维生素的食品中标注的维生素含量^[13]。2010年我国针对乳制品食品安全体系存在的一些列问题作出了相应的规定,出台了最新国家标准作为检测乳品中各种营养素的强制性检测标准,国标GB 5413—

2010^[14]对婴幼儿配方食品与奶粉中维生素含量的检测方法、检测限度、适用范围等都做了明确的规定。作为乳品企业而言,产品必须符合国家的标准才可以出厂,其次了解泛酸的大致范围可以给企业带来新的利润增长点。

牛奶属于动物源性食品,牛奶中泛酸的含量受饲料、季节、环境、种群和牛个体差异的影响较大,所以根据具体的情况数值会有相应的变化,但基本在一定的范围内浮动。泛酸性质比较稳定,在没有菌体污染的情况下损失较少。作为乳制品企业可以根据牛奶中泛酸的本底含量,适量添加泛酸即可以达到要求。

参考文献:

- [1] 王啼东,姚国,薛宇,等.泛酸与泛酸钙[J].兽药饲料添加剂,1997(6): 21-22.
- [2] 张洪渊.生物化学教程[M].成都:四川大学出版社,1994: 240-241.
- [3] 中国营养学会.居民膳食营养素参考[M].北京:中国轻工业出版社,2000: 350-356.
- [4] 丁玉琴,郭俊生,赵法,等.泛酸钙对全饥饿鼠存活时间、尿氮排出与学习记忆影响的实验研究[J].解放军预防医学杂志,2002, 18(2): 12-16.
- [5] 邱璐.泛酸钙、毗多醛、叶酸及生物素时热暴露果蝇的保护作用[J].解放军预防医学杂志,2000, 18(2): 28-29.
- [6] 邹晓庭,金亚颖,金林芳,等.泛酸对母鸡繁殖性能的影响[J].东北农业大学学报,1998, 20(1): 18-23.
- [7] 胡永芬,大成清.养猪不可忽视泛酸[J].国外畜牧学:饲料,1989(1): 29-30.
- [8] 陈宗礼,延志莲,齐龙,等.激素、无机盐、D-泛酸钙及琼脂浓度对红冬快速繁殖的影响[J].延安大学学报:自然科学版,1996, 15(3): 58-61.
- [9] JORG A, KLEIN B P, BECKER D, et al. Biot in method of vitamin assay[M]. 4th edition. New York, USA: John Wiley & Sons Inc., 1985: 507-543.
- [10] 左景善,张丽娟.高效液相色谱法测定婴儿奶粉中的泛酸[J].营养学报,1988, 10(3): 281-285.
- [11] ANGYAL G. Methods for microbiological analysis of selected nutrients [M]. Gaithersburg, USA: AOAC International, 1996: 41-45.
- [12] 廖冰军,左成丽. B 族维生素检测方法及其使用[J].食品安全导刊,2009(8): 40-41.
- [13] 雷涛,张辉,韩惠雯,等.婴幼儿配方奶粉中水溶性维生素的检测方法研究[J].乳业科学与技术,2004(2): 81-83.
- [14] 卫生部. GB 5413.17 — 2010 食品安全国家标准: 婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-7.