

团 体 标 准

T / CIFST 028—2025

乳酸菌产L/D-乳酸定量检测方法

Quantitative determination method of L/D-lactic acid produced
by lactic acid bacteria

2025-04-11 发布

2025-04-11 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。

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：中国食品发酵工业研究院有限公司、国家食品安全风险评估中心、微康益生菌（苏州）股份有限公司、北京工商大学、发酵行业生产力促进中心、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、哈尔滨葵花药业有限公司、雀巢（中国）有限公司、汤臣倍健股份有限公司。

本文件主要起草人：姚粟、于学健、宋雁、方曙光、朱明明、黄明泉、刘冲、刘艺茹、景宇、毛跃建、唐亚利、马微微、柴秋儿、王岗。

乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测方法

1 范围

本文件规定了乳酸菌产 L/D-乳酸的高效液相色谱测定方法。
本文件适用于乳酸菌纯菌菌种发酵液中 L/D-乳酸含量的测定。

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

高效液相色谱法 high performance liquid chromatography; HPLC

高效液相色谱法是采用高压输液泵将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱,对供试品进行分离测定的色谱方法。

3.2

手性分离色谱柱 chiral separation chromatographic column

用手性填充剂填充而成的色谱柱。

3.3

乳酸菌 lactic acid bacteria; LAB

一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称,不能液化明胶、不产生吲哚、革兰阳性、无运动、无芽孢、触酶阴性、硝酸还原酶阴性及细胞色素氧化酶阴性反应的细菌。

3.4

L/D-乳酸 L/D-lactic acid

乳酸,化学名称为 α -羟基丙酸,分子式为 $C_3H_6O_3$,乳酸中有一个不对称的碳原子为手性中心,因此存在两种光学活性构型,即 L-乳酸和 D-乳酸。L-乳酸和 D-乳酸互为光学异构体。

4 原理

乳酸菌在适宜的条件下培养,将发酵液稀释净化后注入高效液相色谱仪,经流动相进入色谱柱中,流动相中金属离子(Cu^{2+})与固定相的手性配体形成金属-配体络合物,样品溶液中 L/D-乳酸根离子通过与已形成的金属-配体络合物发生配位交换,形成暂时性的络合物。两种光学异构体-金属-配体络合物稳定性不同,其在色谱柱中的保留时间不同而实现分离,并通过检测器检测,依据保留时间定性,外标法定量。

5 仪器设备

- 5.1 恒温培养箱: $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.3 分析天平: 感量 $0.000\text{ }1\text{ g}$ 。
- 5.4 涡旋混合器。
- 5.5 离心机: 转速 $\geq 12\text{ }000\text{ r/min}$ 。
- 5.6 生物安全柜或超净工作台。
- 5.7 高压灭菌锅。
- 5.8 高效液相色谱仪, 配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 5.9 手性分离色谱柱。
- 5.10 厌氧培养装置: 厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋或能提供同等厌氧效果的装置。
- 5.11 微量可调移液器及配套吸头: $0.5\text{ }\mu\text{L} \sim 10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L} \sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L} \sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 。

6 试剂或材料

除特别说明外, 仅使用分析纯或生化试剂, 实验用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.1 试剂

- 6.1.1 半胱氨酸盐酸盐。
- 6.1.2 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。
- 6.1.3 L-乳酸(盐)标准品, D-乳酸(盐)标准品: 纯度均 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

6.2 材料

微孔滤膜: $0.22\text{ }\mu\text{m}$, 水相。

无菌接种环: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

6.3 试剂和培养基配制

- 6.3.1 半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基: 见附录 A。
- 6.3.2 1.2 mmol/L 硫酸铜水溶液: 准确称取 299.6 mg (精确至 0.1 mg) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 置于 250 mL 烧杯中, 加入约 200 mL 超纯水, 加热充分溶解后定容至 $1\text{ }000\text{ mL}$, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 水相微孔滤膜过滤后备用。

6.4 标准溶液配制

- 6.4.1 L-乳酸(盐)标准储备液(4.00 mg/mL)和 D-乳酸(盐)标准储备液(4.00 mg/mL): 分别准确称取 L-乳酸(盐)标准品和 D-乳酸(盐)标准品 100.0 mg (精确至 0.1 mg), 加入 10 mL 水溶解并转移至 25 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。
- 6.4.2 L/D-乳酸(盐)混合标准中间液($800.00\text{ }\mu\text{g/mL}$): 分别吸取 2 mL 6.4.1 的 L-乳酸(盐)标准储备液和 D-乳酸(盐)标准储备液, 置于 10 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。
- 6.4.3 L/D-乳酸(盐)混合标准系列工作液: 分别吸取适量 6.4.2 的 L/D-乳酸(盐)混合标准中间液, 用水稀释配制成浓度为 $1.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $10.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $20.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $40.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $80.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、

160.00 $\mu\text{g/mL}$ 、200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作液,临用现配。

注:标准溶液的配制浓度以乳酸光学异构体单体计算。

6.5 质控菌株

单一产生 L-乳酸的菌株:长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) CICC 6069^T 或等效菌株。

单一产生 D-乳酸的菌株:德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) CICC 6047 或等效菌株。

7 检测程序

乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测程序见图 1。

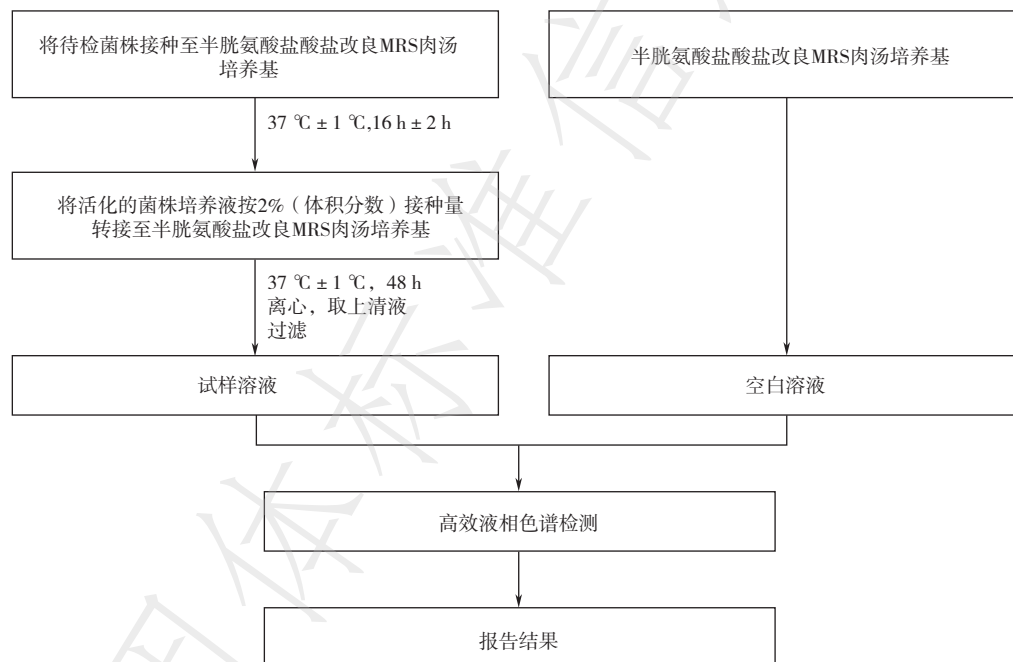


图 1 乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测程序

8 检测步骤

8.1 菌株培养及制备

8.1.1 菌株培养:将纯培养待检菌株接种于半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基中,37 °C ± 1 °C 静置培养 16 h ± 2 h。将上述活化的菌株培养液按 2% (体积分数) 接种量转接至半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基中,在相同培养条件下培养 48 h。其中,双歧杆菌属菌株需厌氧培养。

8.1.2 试样溶液制备:将上述发酵液混匀,取 2 mL 溶液经 12 000 r/min 离心 2 min,将得到的上清液稀释适当倍数(终浓度在标准曲线范围内)后,经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

8.1.3 空白溶液制备:取 2 mL 半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基,经 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,稀释至与试样溶液相同倍数后,经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

8.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：以配位交换型光学活性固定相涂敷或键合于以二氧化硅为填充剂的色谱柱(φ4.6 mm×50 mm,3 μm),或性能相当的色谱柱；
- b) 柱温：25 ℃；
- c) 流动相：1.2 mmol/L 硫酸铜水溶液；
- d) 流速：0.5 mL/min；
- e) 检测波长：254 nm；
- f) 进样量：10 μL。

8.3 标准曲线的制作

将 6.4.3 混合标准系列工作液经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤，分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积。以混合标准系列工作液的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。

8.4 试样溶液和空白溶液的测定

将试样溶液和空白溶液分别注入高效液相色谱仪中，测得相应峰面积，以保留时间定性。根据标准曲线分别计算待测溶液中 L-乳酸和 D-乳酸的含量。

9 结果计算与表述

9.1 结果计算

试样中 L-乳酸和 D-乳酸含量按公式(1)计算：

$$X = \frac{C_1 \times N_1 - C_2 \times N_2}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X ——样品中 L-乳酸或 D-乳酸含量，单位为毫克每毫升(mg/mL)；
- C₁ ——由标准曲线求得试样溶液中被测组分的含量，单位为微克每毫升(μg/mL)；
- C₂ ——由标准曲线求得空白溶液中被测组分的含量，单位为微克每毫升(μg/mL)；
- N₁ ——试样溶液稀释倍数；
- N₂ ——空白溶液稀释倍数；
- 1 000 ——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

9.2 结果表述

检测结果表述为：检出 D-乳酸含量为“×× mg/mL”；L-乳酸含量为“×× mg/mL”。

10 检出限和定量限

本方法的检出限为 0.25 μg/mL，定量限为 0.80 μg/mL。

附录 A

(资料性)

半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 肉汤培养基的制备

A.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	10.0 g
酵母浸粉	5.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温-80	1.0 mL
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g
醋酸钠 $\cdot 3H_2O$	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05 g

A.2 半胱氨酸盐酸盐储备液

称取 500 mg 半胱氨酸盐酸盐加入 10 mL 蒸馏水中,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,临用现配。

A.3 制法

将 A.1 成分加入 990 mL 蒸馏水中,溶解,调节 pH 至 6.2 ± 0.2 ,分装后 121 $^{\circ}C$ 高压灭菌 15 min。临用时用无菌注射器将半胱氨酸盐酸盐储备液加入,使培养基中半胱氨酸盐酸盐的浓度为 500 $\mu g/mL$ 。
