

# 《乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测方法（征求意见稿）》

## 编制说明

### 一、工作简况

#### （一）背景

乳酸广泛存在于人体、动植物、微生物的代谢过程，有 L(+)型和 D(-)型两种光学异构体。人体中的 D-乳酸主要由肠道微生物代谢产生，如 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* 等结肠乳酸菌可合成 D-乳酸，而其代谢清除主要在肝脏及肾脏中，与 L-乳酸相比，D-乳酸代谢较慢更易积累，当 D-乳酸的产生超过消除速率，可能引起酸中毒，婴幼儿因肝肾功能不成熟，对 D-乳酸代谢清除能力更低，比年龄较大的儿童及成人面临更大的代谢性酸中毒风险，因此对食品用菌种尤其是可用于婴幼儿食品的菌种产 D-乳酸的检测与评价至关重要。

国内外均有法规规定对食品用菌种的 D-乳酸含量进行测定，但目前未见适用于微生物发酵液中 L/D-乳酸定性定量的标准检测方法。本项目基于高效液相色谱结合手性色谱柱方法，通过系统的方法学验证及适用性研究，建立了乳酸菌产 L/D-乳酸的定量检测标准方法，为满足食品用菌种的安全性评价需求提供技术支撑，对促进益生菌在食品行业更加安全和广泛的应用具有重要意义。

#### （二）主要起草过程

项目任务来自《中国食品科学技术学会关于发布 2024 年团体标准立项计划（第一批）的通知》（中食学字〔2024〕第 001 号），项目编号为 ttbz-2024-002。2023 年 8 月，起草组向中国食品科学技术学会提出《乳酸菌产 L/D-乳酸定量检测方法》团体标准立项申请，同时，在充分整理研究数据、收集国内外相关法规标准的基础上，制定了详细的工作计划。2023 年 8 月至 2025 年 5 月，组织开展了方法建立、方法验证研究，形成团体标准初稿。2024 年 6 月，组织召开标准启动暨专家研讨会，与会专家一致认为标准建立和方法验证过程设计合理、数据详实、科学可行，对促进食品用菌种在婴幼儿食品行业广泛应用具有重要意义，是对现有标准的必要补充，建议完善实验室间比对、方法适用性等验证数据，进一步规范标准文本、完善技术参数。2024 年 6 月至 2024 年 9 月，组织开展三家实验室的方法验证比对、方法适用性研究，根据专家意见，完善形成标准征求意见

稿。

## 二、国内外相关法规标准情况

国际上，FAO/WHO《食品益生菌评价指南（2002年）》对益生菌产D-乳酸的检测与评价提出要求，国际食品法典委员会（CAC）发布的CXS 72-1981（2020版）《婴儿配方及特殊医用婴儿配方食品标准》、CXS 74-1981（2019版）《谷基类婴幼儿加工食品法典标准》规定，乳酸菌中仅产L-乳酸的菌株可用于婴儿配方、特殊医用婴儿配方食品及谷基类婴幼儿加工食品。目前L/D-乳酸的测定方法有ISO 8069-2005《奶粉-乳酸和乳酸盐含量的测定 酶催化法》、DIN 10335-2010《除奶粉外的乳和乳制品 L/D-乳酸(L/D-乳酸盐)含量的测定 酶催化法》、BS EN 12631-1999《水果和蔬菜汁 L/D-乳酸(L/D-乳酸盐)含量的酶法测定 NAD 光谱法》等标准。目前国际上尚无适用于微生物发酵液中L/D-乳酸定量的标准检测方法。

在我国，《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序（征求意见稿）》中要求对直接添加到供1岁以下婴儿食品用的菌种进行D-乳酸的测定。在测定方法上，GB 1886.173-2016《食品安全国家标准 食品添加剂乳酸》规定采用高效液相色谱法对L/D-乳酸进行定性检测，采用滴定法进行定量检测；QB/T 5712-2022《发酵液中L-乳酸的测定 酶电极法》采用酶电极法测量发酵液中的L-乳酸含量。但我国尚未发布乳酸菌发酵液中L/D-乳酸定量检测相关技术标准。

## 三、标准主要技术内容

### （一）方法建立

通过文献检索和实验验证，确定了柱温、流动相浓度等色谱条件，色谱条件为流动相：1.2 mmol/L 硫酸铜水溶液，流速：0.5 mL/min；柱温：25℃，检测波长 254 nm，进样量：10 μL，可实现分离两组分与杂质峰分离，满足检测乳酸菌发酵液中L/D-乳酸的要求。根据乳酸菌生长特性选择MRS培养基（含0.05%半胱氨酸盐酸盐），并通过测定不同培养时间中菌株产L/D-乳酸情况，确定菌株培养时间为48 h时产酸量稳定。

### （二）方法验证

参考ISO 16140-2:2016《食物链微生物学—方法验证—第2部分：针对参考方法的替代（专有）方法验证》、《中国药典》（2020版）<9201>药品微生物检验替代方法验证指导原则、<9101>分析方法验证指导原则、GB 4789.45-2023《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》、GB 5009.295-2023《食品安全国家标

准 化学分析方法验证通则》、GB/T 35655-2017《化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南 色谱分析》等标准进行方法验证参数的设计与评价。

## 1. 实验室内验证

在实验室内对该方法的准确度、专属性、精密度、定量限、线性、范围、耐用性、不确定度参数进行方法学验证。

(1) **准确度**：在验证菌株发酵液中加入不同浓度的L/D-乳酸标准品溶液，计算加标回收率。结果显示，L/D-乳酸各浓度梯度的回收率结果在85%-110%之间，表明该方法检测结果具有可靠性。

(2) **专属性**：对验证菌株色谱图进行分析，结果显示各样品中保留时间与标准品保留时间具有一致性，杂质峰对待测组分积分无影响，表明该方法适用于乳酸菌发酵液中L/D-乳酸的定量检测。

(3) **精密度**：各验证菌株分别进行10次平行发酵，并测定发酵液中L/D-乳酸含量。各菌株10次重复实验结果的相对标准偏差 $RSD \leq 10\%$ ，表明该方法具有良好的稳定性。

(4) **定量限**：以10倍信噪比的浓度作为估算定量限，在半胱氨酸盐酸盐改良MRS肉汤培养基分别加入系列低浓度的L-乳酸和D-乳酸标准品，结果显示当样品中L/D-乳酸浓度 $\geq 0.8 \mu\text{g/mL}$ 时，样品中的L/D-乳酸可被准确定量。

(5) **线性**：当L/D-乳酸浓度在 $0.8-200.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内，理论值与测定值线性拟合关系较好， $R^2 > 0.999$ 。

(6) **范围**：综合准确度、定量限、线性结果，所建立的方法检测范围为 $0.8-200.0 \mu\text{g/mL}$ 。

(7) **耐用性**：验证不同批次培养基，样品制备后储存时间对检测结果的影响，结果显示改变培养基批次，样品制备后储存时间下检测结果的相对标准偏差 $RSD \leq 10\%$ ，所建方法具有良好的耐用性。

(8) **不确定度**：选择代表性菌株鼠李糖乳酪杆菌GG进行重复检测，并量化检测过程中各不确定度分量，对该方法进行不确定度分析，得到合成标准不确定度及扩展不确定度。L-乳酸的相对扩展不确定度为0.0764；D-乳酸的相对扩展不确定度为0.1048。

## 2. 实验室间验证

在中国食品药品检定研究院、北京市疾病预防控制中心、中轻检验认证有限

公司三家实验室开展实验室间验证实验。分别由不同人员，在不同实验室，使用不同仪器对各菌株产 L/D-乳酸进行检测，结果显示各实验室检测结果相对标准偏差  $RSD \leq 15\%$ ，该方法在不同实验室间的检测结果具有较好的稳定性。

### （三）方法适用性研究

收集《可用于婴幼儿食品的菌种名单》及《可用于食品的菌种名单》中 30 余种代表性乳酸菌，采用本标准方法开展适用性评价工作。结果表明，所建方法方法对乳酸菌发酵液中 L/D-乳酸检测的适用性良好。

## 四、其他需要说明的事项

无。