

微生物法测定肠内营养粉剂中微量维生素 B₁₂的含量

蒋孟虹, 许 苹, 秦 峰, 刘 浩, 杨美成*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立微生物法测定肠内营养粉剂中微量维生素 B₁₂ 的含量。**方法** 以莱士曼氏乳酸杆菌为实验菌, 在测定用培养基中供给除维生素 B₁₂ 以外的所有营养成分, (36±1) °C 培养 19~20 h, 采用比浊法测定。**结果** 维生素 B₁₂ 在 0.001~0.010 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 肠内营养粉剂中维生素 B₁₂ 的含量为 2.9 μg/100 g。**结论** 该方法检测结果准确、可靠, 适用于肠内营养粉剂中微量维生素 B₁₂ 的含量测定。

关键词: 维生素 B₁₂; 肠内营养粉剂; 微生物法

Determination of trace vitamin B₁₂ in enteral nutrition powder by microbiological method

JIANG Meng-Hong, XU Ping, QIN Feng, LIU Hao, YANG Mei-Cheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of trace vitamin B₁₂ in enteral nutrition powder by microbiological method. **Methods** The test organism was *Lactobacillus leichmannii*. The medium without vitamin B₁₂ was used as assay medium. The sample were incubated for 19~20 h at the temperature of (36±1) °C and measured by microbial turbidimetric method. **Results** Vitamin B₁₂ had a good linear relationship in the range of 0.001~0.010 ng/mL, and the content of vitamin B₁₂ in enteral nutrition powder was 2.9 μg/100 g. **Conclusion** This method is accurate and reliable, and suitable for the assay of trace vitamin B₁₂ in enteral nutrition powder.

KEY WORDS: vitamin B₁₂; enteral nutrition powder; microbiological method

1 引言

维生素 B₁₂ 又称氰钴素或钴胺素, 是一类由含钴的卟啉类化合物组成的 B 族维生素, 是唯一含有金属离子的水溶性维生素, 在维持机体正常造血功能和神经系统功能健全中起到至关重要的作用, 是人体必需的维生素。维生素 B₁₂ 参与人体细胞如骨髓红细胞的代谢, 影响 DNA 的生物合成与调节, 还参与

蛋白质、脂肪酸等的合成与代谢^[1], 维生素 B₁₂ 不能自身合成, 故人体只能从膳食、药物或保健食品中摄取。维生素 B₁₂ 一旦摄入过量会产生毒副作用, 如导致叶酸缺乏, 还可能引起过敏反应, 甚至造成过敏性休克^[2-4]。因此, 准确测定肠内营养粉剂中微量维生素 B₁₂ 的含量非常必要。

目前, 维生素 B₁₂ 的测定方法有高效液相色谱法^[5-11]、化学发光法^[12]、毛细管电泳法^[13]、酶联免疫法

*通讯作者: 杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

*Corresponding author: YANG Mei-Cheng, Ph.D., Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

[14]、微生物法^[15-16]等。高效液相色谱法为常用方法,但由于该方法仅适用于常量分析,并且由于维生素 B₁₂ 的复方制剂基质复杂,对色谱前处理要求高,因此该方法难以满足痕量测定的要求。而采用微生物法测定维生素 B₁₂ 的复方制剂,具有一定的应用^[16]。

微生物法操作步骤较多,测试菌液加入量、测定时间的一致性等因素均可影响测定结果的准确性,故考察微生物法测定维生素 B₁₂ 的实验影响因素十分必要。本研究采用微生物法,利用莱士曼氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus leichmannii*) 对维生素 B₁₂ 的特异性和灵敏性,在供给除维生素 B₁₂ 以外的所有营养成分的测定培养基中,添加标准曲线工作液以及未知待测溶液,根据微生物生长产生的透光率,对肠内营养粉剂中微量维生素 B₁₂ 的含量进行测定,并分析、总结实验过程中的相关技术要点,如测试菌液透光率、测试菌液加入量、培养及比色时间等,为微生物法在常规实验室的建立和应用提供参考,为维生素 B₁₂ 的痕量测定提供思路。

2 材料与方

2.1 材料与试剂

分析天平(CP225D, Sartorius); pH 计(Seven easy, Mettler Toledo); 旋涡混合器(MS 3, IKA); 高压灭菌器(HVA-85, Hirayama); 恒温培养箱(KB240, Binder); 紫外可见分光光度计(UV2450, 日本岛津公司)。

莱士曼氏乳酸杆菌(ATCC 7830, American Type Culture Collection); 维生素 B₁₂ 标准品(纯度 96.2%, 批号: 203B, 美国药典委员会); 肠内营养粉剂(批号: 100361526); 乳酸杆菌琼脂培养基(美国 BD 公司); 乳酸杆菌肉汤培养基(美国 BD 公司); 维生素 B₁₂ 测

定用培养基(青岛日水生物技术有限公司); 乙醇(分析纯, 上海振兴化工一厂)。

2.2 检测方法

2.2.1 测试菌液的制备

将冻干菌株莱士曼氏乳酸杆菌活化后, 穿刺接种到乳酸杆菌琼脂培养基上, (36±1) °C 培养 24 h, 再转种 2~3 代以增强活力。并在乳酸杆菌肉汤培养基中接种活化后的菌株, 于(36±1) °C 培养 18~24 h, 将培养基以 2000 r/min 离心 2~3 min, 弃去上清液, 加入 10 mL 生理盐水, 混匀。如前离心操作, 弃去上清液 2 次。再加 10 mL 生理盐水, 混匀。量取菌悬液适量于 10 mL 生理盐水中, 混合均匀制成测试菌液。采用分光光度计, 以 550 nm 为检测波长, 生理盐水为空白溶剂, 测定测试菌液的透光率, 使其透光率在 60%~80% 之间。

2.2.2 标准曲线的制作

(1) 标准溶液的制备

维生素 B₁₂ 贮备液(10 µg/mL): 精密称定约 20 mg 维生素 B₁₂ 标准品, 用乙醇溶液(体积分数为 25%) 溶解稀释至维生素 B₁₂ 浓度为 10 µg/mL。

维生素 B₁₂ 中间液(100 ng/mL): 用乙醇溶液将 5.0 mL 维生素 B₁₂ 贮备液定容至 500 mL。

维生素 B₁₂ 工作液(1 ng/mL): 用乙醇溶液将 5.0 mL 维生素 B₁₂ 中间液定容至 500 mL。

标准曲线工作液: 分别精密量取维生素 B₁₂ 工作液适量, 用水稀释至高浓度溶液的浓度为 0.02 ng/mL, 低浓度溶液的浓度为 0.01 ng/mL。

(2) 标准曲线的制备

按表 1 一式 4 份, 依次在试管内加入标准曲线工作液、水和维生素 B₁₂ 测定用培养基, 涡旋使混合均匀。

表 1 标准曲线的制备

Table 1 Preparation of standard curve

试管号	0.01 ng/mL 标准曲线工作液(mL)	0.02 ng/mL 标准曲线工作液(mL)	水(mL)	培养基(mL)
S1	0	0	5	5
S2	0	0	5	5
S3	1	0	4	5
S4	2	0	3	5
S5	3	0	2	5
S6	4	0	1	5
S7	5	0	0	5
S8	0	3	2	5
S9	0	4	1	5
S10	0	5	0	5

2.2.3 试样的处理

称取无水磷酸氢二钠 1.3 g, 无水偏重亚硫酸钠 1.0 g, 柠檬酸(含 1 个结晶水)1.2 g, 用 100 mL 水溶解。称取一定量的样品(注意样品混合均匀), 用 10 mL 缓冲溶液混合后, 再加 150 mL 水。通过热分解或者酶分解的方式, 可将与蛋白质结合的内源性维生素分解成游离态, 从而被测定。故采用热分解方式, 将样品于 121 °C 水解 10 min, 将维生素释放出来, 帮助样品中维生素 B₁₂ 水解时更好地释放。冷却后, 调节 pH 至 4.5±0.2, 使样品中的蛋白质得以沉淀。再用水定容至 250 mL, 过滤。移取 5 mL 滤液至 100 mL 量瓶中, 加水 20~30 mL, 调 pH 至 6.8±0.2, 从而确保莱士曼氏乳酸杆菌和维生素 B₁₂ 能在 pH 值为中性的环境下培养, 最后用水稀释至刻度。

2.2.4 待测溶液的制备

按表 2 一式 4 份, 依次在试管内加入样品溶液、水和维生素 B₁₂ 测定用培养基, 涡旋使混合均匀。

表 2 待测溶液的制备
Table 2 Preparation of samples

试管号	待测液(mL)	水(mL)	培养基(mL)
1	1	4	5
2	2	3	5
3	3	2	5
4	4	1	5

2.2.5 灭菌、接种及培养

将所有试管放置高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 5 min, 取出并迅速冷却至 30 °C 以下。用移液器向上述试管中各加 50 μL 的测试菌液(其中标准曲线管中空白 S1 除外), 涡旋混合均匀后, 放入恒温培养箱内, (36±1) °C 培养 19~20 h。

2.2.6 测定

待培养结束后, 目测观察未接种测试菌液的试管 S1, 其培养液体应为澄清, 如显浑浊, 则为无效测定。若测定有效, 则以维生素 B₁₂ 标准品的浓度为横坐标, 其透光率为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程。根据待测液的透光率, 从线性回归方程计算得出该待测溶液中维生素 B₁₂ 的浓度, 并以稀释因子和样品称样量计算试样中维生素 B₁₂ 的含量。

3 结果与分析

3.1 测试菌液的制备

3.1.1 测试菌液透光率的确定

通过对不同透光率的测试菌液进行考察, 透光

率过高的菌液导致标准曲线溶液呈无规律生长, 而透光率过低的菌液导致不同浓度标准曲线溶液之间的透光率差异小, 均导致线性拟合差。通过实验比较, 最终确定当测试菌液的透光率在 60%~80%之间时, 线性拟合较好。

3.1.2 测试菌液加入量的考察

测试菌液加入量的不同影响莱士曼氏乳酸杆菌的生长情况, 故在标准曲线中, 分别加入 25、50、100、200 μL 4 种不同体积的测试菌液, 考察其对结果的影响。实验结果表明, 加菌过多易导致标准曲线生长浊度过高而导致不成梯度, 无法比色而实验失败。当测试菌液的加入量为 50 μL 时, 标准曲线线性拟合良好。

3.2 标准曲线的制作

标准曲线的反应体系均为 10 mL, 其中培养基含量同为 5 mL, 但标准溶液为梯度体积, 以水补足使得总体积为 10 mL, 制成浓度梯度分别为 0.0005、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.008、0.010、0.015、0.020、0.025 ng/mL 的标准曲线, 考察不同浓度梯度标准曲线的线性。实验结果表明, 当浓度较高时, 高浓度点的透光率接近, 导致标准曲线不成线性。说明在维生素 B₁₂ 含量较高时, 随着含量的增加, 菌体的生长、繁殖没有明显的变化。其可能的原因是标准管中维生素 B₁₂ 的含量偏高, 维生素 B₁₂ 的含量不是菌体生长繁殖的限制性因素, 而培养基中营养物质的消耗与有害代谢产物的堆积成为限制菌体生长繁殖的重要因素。此时菌体的增殖速度逐渐减慢, 同时部分菌体相继死亡, 增殖率与死亡率基本达到一致, 菌体的生长进入稳定期, 甚至已经停止繁殖, 进入衰亡期。故最终确定标准曲线系列浓度为 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.008、0.010 ng/mL。

3.3 待测液的制备

待测样品的反应体系也为 10 mL, 其中培养基含量同为 5 mL, 待测液体积的加入量分别为 1、2、3、4 mL, 以水补足使得总体积为 10 mL。为了使得待测液的浓度范围在标准曲线线性范围之内, 最终样品溶液中维生素 B₁₂ 的质量浓度应约在 0.01~0.02 ng/mL。通过对不同称样量样品的考察(称量分别为 1、2、4、8 g), 最终确定样品称样量为 2 g。

由于样品溶液不澄清, 其浑浊程度影响透光率

的测定。故采用无菌空白试样(只加培养基不加菌),扣除本底进行测定。

3.4 培养及测定时间的考察

将已加入测试菌液的试管用涡旋仪混合均匀,放入(36±1)℃的恒温培养箱中培养19~20 h。培养时确保试管间存在适当的间隔,维持空气的流通,使受热均匀。为了更好地把握比色终点,培养18 h后,每隔1 h比色一次判断比色终点。20 h左右,使用涡旋仪混合均匀以帮助生长,注意比较浊度,随时准备测定。通过实验考察比较,标准曲线最高浓度点的透光率在30%左右时为最佳测定时间,此时各浓度点的透光率差别较大,可拉开梯度。

3.5 标准曲线的绘制

以维生素B₁₂标准曲线系列管测定的透光率平均值为纵坐标,以维生素B₁₂的浓度为横坐标,进行线性回归并绘制标准曲线(图1)。维生素B₁₂在0.001~0.010 ng/mL浓度范围内线性关系良好,线性回归方程为 $Y=-5896.983X+92.203$, $r=0.99$ 。

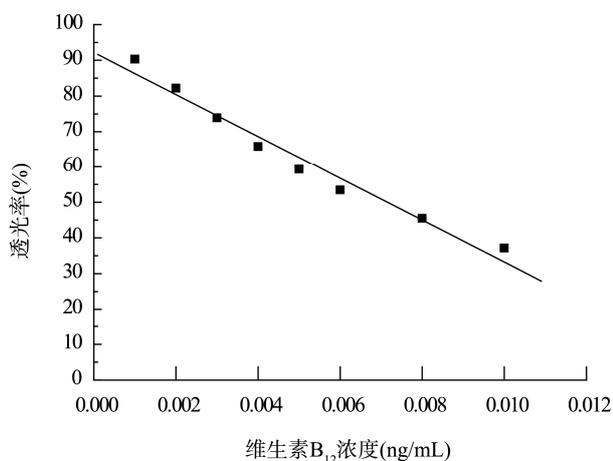


图1 维生素B₁₂标准曲线图

Fig. 1 Standard curve of vitamin B₁₂

3.6 样品测定

根据各编号待测液的试管透光率,通过线性回归方程,计算出每毫升该编号待测液中维生素B₁₂的浓度,并计算其平均值。将每支试管测定的浓度与平均浓度比较,不得超过±15%,若超过,则将数据舍弃。最终根据符合要求的数据计算待测液中维生素B₁₂的浓度,并根据稀释因子和样品称样量计算出肠内营养粉剂中维生素B₁₂的含量为2.9 μg/100 g。

4 结论

本研究采用微生物比浊法测定肠内营养粉剂中微量维生素B₁₂的含量,该方法检出限低、灵敏度高,测定结果准确可靠,适用于微量维生素B₁₂的含量测定,值得经常进行维生素检测的实验室应用推广。

参考文献

- [1] 吕颖坚, 黄俊明. 维生素B₁₂的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(4): 394-399.
Lv YJ, Huang JM. Progress on the studies of vitamin B₁₂[J]. Chin Food Hyg, 2012, 24(4): 394-399.
- [2] Suarez L, Hendricks K, Felkner M, et al. Maternal serum B₁₂ levels and risk for neural tube defects in a Texas-Mexico border population [J]. Ann Epidemiol, 2003, 13(2): 81-88.
- [3] Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, et al. Maternal vitamin B₁₂ status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic acid fortification [J]. Pediatrics, 2009, 123(3): 917-923.
- [4] 鲁杰, 杨大进, 王竹天. 维生素B₁₂化学分析法研究概况[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(3): 248-252.
Lu J, Yang DJ, Wang ZT. Review of chemical methods for determining cyanocobalamin [J]. Chin Food Hyg, 2003, 15(3): 248-252.
- [5] Guggisberg D, Risse MC, Hadorn R. Determination of vitamin B₁₂ in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column [J]. Meat Sci, 2012, 90(2): 279-283.
- [6] 郝岩平, 姜金斗, 房玉国. HPLC法测定婴幼儿配方奶粉复合维生素添加剂中维生素B₁₂方法的研究[J]. 中国食品添加剂, 2004, (2): 93-96.
Hao YP, Jiang JD, Fang YG. Research on the determination method of vitamin B₁₂ in composite vitamin additives for milk powder and formula by HPLC [J]. China Food Addit, 2004, (2): 93-96.
- [7] 储小军, 陶保华, 赖世云, 等. 固相萃取-二维液相色谱法测定婴幼儿配方食品中的维生素B₁₂[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2013, 39(2): 185-190.
Chu XJ, Tao BH, Lai SY, et al. Quantification of vitamin B₁₂ in infant formula by dimensional liquid chromatography with solid phase extraction [J]. J Zhejiang Univ (Agric Life Sci), 2013, 39(2): 185-190.
- [8] 吴楠, 姜金斗, 陶大利, 等. 免疫亲和柱净化/高效液相色谱法测定乳粉中维生素B₁₂含量[J]. 分析测试学报, 2013, 32(3):

- 389–392.
- Wu N, Jiang JD, Tao DL, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ content in milk powder by immunoaffinity column purification-HPLC method [J]. *J Instrumental Anal*, 2013, 32(3): 389–392.
- [9] 刘娜, 陈大舟, 汤桦, 等. 婴儿配方奶粉中 8 种水溶性维生素的高效液相色谱同时测定 [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(4): 408–411.
- Liu N, Chen DZ, Tang H, *et al.* Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in baby milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *J Instrumental Anal*, 2008, 27(4): 408–411.
- [10] 任丹丹, 谢云峰, 刘佳佳, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 9 种水溶性维生素 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(3): 899–904.
- Ren DD, Xie YF, Liu JJ, *et al.* Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in foods by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(3): 899–904.
- [11] GB/T 5009.217-2008 保健食品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
GB/T 5009.217-2008 Determination of vitamin B₁₂ in health foods [S].
- [12] Karmi O, Zayed A, Suheir Baraghehi, *et al.* Measurement of vitamin B₁₂ concentration: a review on available methods [J]. *IIOAB J*, 2011, 2(2): 23–32.
- [13] Chen JH, Jiang SJ. Determination of cobalamin in nutritive supplements and chlorella foods by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(4): 1210–1215.
- [14] L Sagaya SK, Thakur MS. Competitive immunoassay for analysis of vitamin B₁₂ [J]. *Anal Biochem*, 2011, 418(2): 238–246.
- [15] 吴环, 刘冬虹, 张慧, 等. 微生物法快速检测食品中维生素 B₁₂ 含量的应用研究[J]. *中国乳业*, 2014, 148: 42–44.
- Wu H, Liu DH, Zhang H, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ content in milk powder by immunoaffinity column purification-HPLC method [J]. *China Dairy*, 2014, 148: 42–44.
- [16] GB5413.14-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
GB5413.14-2010 Food safety national standard-Determination of vitamin B₁₂ in food for infants and young children, milk and milk products [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



蒋孟虹, 硕士, 药师, 主要研究方向为药品、食品检验。
E-mail: jmh1122ow@163.com



杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。
E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com