

偏重亚硫酸钠对微生物法测定维生素 B₁₂ 含量的影响

杨亚芳[#], 李倩[#], 刘凯, 郭晶晶, 毕思丹, 杨文炼, 李爽, 王雨婷, 巴冬梅, 蔡雪凤^{*}

[北京市食品安全监控和风险评估中心(北京市食品检验所), 国家食品质量安全检验监督中心, 北京 100094]

摘要: **目的** 探究偏重亚硫酸钠对微生物法测定婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂(vitamin B₁₂, VB₁₂)含量的影响。**方法** 通过在标准工作液和样品待测液中添加质量浓度梯度为 0、0.0025、0.005、0.02、0.08 和 0.16 mg/mL 偏重亚硫酸钠, 测定不同处理组实验样品中 VB₁₂ 含量值并对质控样品进行质控结果分析, 研究偏重亚硫酸钠对莱士曼氏乳杆菌生长的促进作用及其对原生 VB₁₂ 提取的影响。**结果** 在标准溶液中添加质量浓度为 0~0.16 mg/mL 的偏重亚硫酸钠都可以促进莱士曼氏乳杆菌的生长。在 0~0.05 mg/mL 的范围内时, 偏重亚硫酸钠能促进样品中原生 VB₁₂ 的提取, 且随偏重亚硫酸钠质量浓度增加, 原生 VB₁₂ 的提取会成比例增加。**结论** 偏重亚硫酸钠在 0~0.16 mg/mL 浓度范围内可以促进莱士曼氏乳杆菌的生长, 提高食品原生 VB₁₂ 的提取率, 进而增加检测结果的稳定性和准确度。

关键词: 维生素 B₁₂; 微生物法; 偏重亚硫酸钠; 莱士曼氏乳杆菌

Influence of sodium metabisulfite on the determination of vitamin B₁₂ by microbiological method

YANG Ya-Fang[#], LI Qian[#], LIU Kai, GUO Jing-Jing, BI Si-Dan, YANG Wen-Lian, LI Shuang, WANG Yu-Ting, BA Dong-Mei, CAI Xue-Feng^{*}

[Beijing Food Safety Monitoring and Risk Assessment Center (Beijing Food Inspection Institute), National Food Quality and Safety Inspection and Supervision Center, Beijing 100094, China]

ABSTRACT: Objective To explore the effect of sodium metabisulfite on the determination of vitamin B₁₂ (VB₁₂) in infant food and dairy products by microbiological method. **Methods** By adding mass concentration gradients of 0, 0.0025, 0.005, 0.02, 0.08 and 0.16 mg/mL sodium metabisulfite to the standard working solution and the sample solution, the content of VB₁₂ in the experimental samples of different treatment groups was detected and the results of quality control samples were analyzed, the promotion node of sodium metabisulfite on *Lactobacillus leichmannii* and its effect on the extraction of the original form of VB₁₂ were explored. **Results** Adding sodium metabisulfite with a mass concentration of 0–0.16 mg/mL to the standard solution could promote the growth of *Lactobacillus leichmannii*.

[#]杨亚芳、李倩为共同第一作者。

[#] YANG Ya-Fang and LI Qian are Co-first Authors.

基金项目: 首都食品质量安全保障基金项目 (Z191100008619007)

Fund: Supported by the Capital Food Quality and Safety Guarantee Foundation (Z191100008619007)

*通信作者: 蔡雪凤, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物学检测、分子生物学检测。E-mail: caixuefeng@mail.beijing.gov.cn

*Corresponding author: CAI Xue-Feng, Senior Engineer, Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment (Beijing Institute for Food Control), No.17, Fengde East Road, Yongfeng Industrial Base, Haidian District, Beijing 100094, China. E-mail: caixuefeng@mail.beijing.gov.cn

Sodium metabisulfite could promote the extraction of native VB₁₂ in the samples in the range of 0–0.05 mg/mL, and as the concentration of sodium metabisulfite increases, the extraction of native VB₁₂ would be proportionally increased. **Conclusion** In the concentration range of 0–0.16 mg/mL, sodium metabisulfite can promote the growth of *Lactobacillus leichmannii*, increase the extraction rate of native VB₁₂, and thereby increase the stability and accuracy of the test results.

KEY WORDS: vitamin B₁₂; microbiological method; sodium metabisulfite; *Lactobacillus leichmannii*

0 引言

维生素 B₁₂(vitamin B₁₂, VB₁₂)又称钴胺素,是唯一含有金属离子的水溶性维生素^[1]。VB₁₂可促进碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢,可以增加叶酸的利用率^[2],同时参与神经组织中一种脂蛋白的形成,是神经系统功能健全不可缺少的维生素。VB₁₂微量缺乏会引起心情压抑和慌乱,严重缺乏则易产生疲劳、神经衰弱和阿尔兹海默病等^[3],但过量的 VB₁₂会引发荨麻疹、湿疹、哮喘、面部浮肿等过敏反应,也可导致叶酸的缺乏以及神经兴奋、心前区痛和心悸等^[4]。人体自身无法合成 VB₁₂,需要从外界摄入,婴儿每日建议摄入量为 0.52~1.5 μg。因此,婴幼儿配方食品、特殊医疗配方食品中 VB₁₂测定结果的准确性就尤为重要。

目前 VB₁₂ 的检测方法主要有仪器法^[5-8]、酶联免疫法^[9]、化学发光分析法^[10-11]和微生物法。微生物法可灵敏地检测出样品中具有生物活性的 VB₁₂ 总量,这是微生物法区别于其他方法的最大特点,也是仪器分析方法很难做到的。美国官方分析化学家协会手册(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)^[12]及 GB 5413.14—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》都将微生物法作为 VB₁₂ 检测的首选方法和仲裁方法。国标中微生物法是利用偏重亚硫酸钠溶液来提取试样中的 VB₁₂,使溶液中的氰钴胺素或羟钴胺素转变成能被莱士曼氏乳杆菌利用的亚硫酸合钴胺素,利用莱士曼氏乳杆菌对 VB₁₂ 的灵敏性和特异性^[13],通过测定培养后的莱士曼氏乳杆菌的菌浓度来推算出试样中 VB₁₂ 含量。VB₁₂ 的提取主要包括 2 方面:①将样品中与蛋白结合的钴胺素释放出来;②将不稳定形式的钴胺素转变为能被莱士曼氏乳杆菌利用的亚硫酸合钴胺素。标准中规定样品经过水解稀释后的最终溶液中偏重亚硫酸钠的质量浓度应小于 0.03 mg/mL,超过该浓度时,偏重亚硫酸钠会抑制莱士曼氏乳杆菌的生长,从而导致检测结果的不准确。但是在实际检测时发现,质控样品结果总是高于给定的范围值[(4.82±0.85) μg/100 g]的上限,而且目前国内外对偏重亚硫酸钠的研究主要集中在食品防腐剂、漂白剂、疏松剂、保鲜剂以及动物饲料添加剂等^[14-17]。关于偏重亚硫酸钠在婴幼儿食品和乳品中 VB₁₂ 含量检测方面的可参考资料和研究甚少。为了解决这一问题,本研究依据偏重亚硫酸钠和 VB₁₂ 以及莱士曼氏乳杆菌的反应原理关系设

计实验,研究偏重亚硫酸钠对微生物法测定婴幼儿食品和乳品中 VB₁₂ 含量的影响,以期解答偏重亚硫酸钠不同的添加量是否会影响原生 VB₁₂ 的测定结果的疑问,从而为提高微生物法对于 VB₁₂ 测定结果的准确度提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品

市售婴幼儿配方乳粉(奶粉 1:雀巢,奶粉 2:雅培);全脂灭菌牛奶(牛奶 1:发喜全脂牛奶,牛奶 2:黑沃牧场全脂牛奶,牛奶 3:三元全脂牛奶);SRM1849A 质控样(national institute of standards and technology, NIST)^[18]。

1.1.2 实验菌株和培养基

莱士曼氏乳杆菌 *Lactobacillus leichmannii* CICC6077(等效 ATCC7830,中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

VB₁₂ 接种琼脂、VB₁₂ 接种肉汤、VB₁₂ 测试肉汤培养基(美国 BD 公司)。

1.1.3 实验试剂

偏重亚硫酸钠、一水合柠檬酸(分析纯,广东西陇科学股份有限公司);磷酸氢二钠(分析纯,北京益利精细化学有限公司);VB₁₂ 标准品(纯度 95.9%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);实验室用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

MS30325 漩涡振荡器(德国 IKA 公司);S470-K pH 计、XSE105 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);ZXDP-R2800 恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);G180TW 高压蒸汽灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司];UV2550 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌悬液的制备及添加

将莱士曼氏乳杆菌的冻干菌株活化以后,接种到 VB₁₂ 琼脂培养基斜面上,36 °C 培养 20~24 h。继续转种 2~3 代增加活力^[19]后保存在 10% 的甘油 VB₁₂ 接种肉汤中,-80 °C 保存。

将冷冻的甘油肉汤菌株平衡到室温,用 VB₁₂ 接种琼脂活化 2~3 代后的菌株接种到 VB₁₂ 接种肉汤培养基中,36 °C 培养 18~24 h,培养后菌悬液离心弃上清,加入适量的无菌生理盐水振荡均匀后再次离心并弃去上清液,重复

操作 3 次。将最后 1 次离心后的上清液弃掉,加入定量新的生理盐水混匀制成测试菌液。

1.3.2 样品前处理

本次实验根据偏重亚硫酸钠不同的添加量配制 6 种 VB₁₂ 水解缓冲液,其配制方法如表 1 所示。根据实验设计,各实验组分别在前处理过程中加入 6 种 VB₁₂ 水解缓冲液,前处理均参照国家标准 GB 5413.14—2010 规定的操作方法。

1.3.3 实验设计

(1)偏重亚硫酸钠质量浓度对莱士曼氏乳杆菌生长率的影响

配制 6 种浓度均为 1 ng/mL,体积 100 mL 的 VB₁₂ 工作液,偏重亚硫酸钠的添加量分别为 0、12.5、25、100、400、800 mg,编号分别为 b0、b1、b2、b3、b4、b5。再根据国标要求将 6 组 VB₁₂ 工作液配制成标准曲线工作液备用,偏重亚硫酸钠在标准曲线工作液中(c0~c5)的质量浓

度及实验分组如表 2 所示。其中 A0 配制方法与国标中规定完全一致;A3 组(0.02 mg/mL)与国标中样品水解后稀释 5000 倍的最终溶液中偏重亚硫酸钠的质量浓度一致,其余操作步骤均按照 GB 5413.14—2010 进行处理。

(2)偏重亚硫酸钠对不同样品 VB₁₂ 含量检测的影响

选取市售 2 种不同品牌的奶粉和 3 种不同品牌天然牛奶及 SRM1849A 质控样作为实验样品,研究在样品前处理过程中偏重亚硫酸钠对不同样品 VB₁₂ 含量检测的影响。实验分组及各实验组样品前处理过程中偏重亚硫酸钠添加情况如表 3 所示。后续检测流程同 GB 5413.14—2010。

(3)偏重亚硫酸钠浓度对样品中原生 VB₁₂ 提取效果的影响

选取质控样品 SRM1849A 和 3 种天然样品牛奶作为实验样品,在样品水解时分别添加编号为 a0~a5 的缓冲液,实验分组如表 4 所示。

表 1 6 种 VB₁₂ 水解缓冲液配制方法
Table 1 Preparation method of 6 kinds of VB₁₂ hydrolysis buffers

缓冲液种类	偏重亚硫酸钠/g	无水磷酸氢二钠/g	柠檬酸/g	高纯水/mL	最终溶液中偏重亚硫酸钠的质量浓度/(mg/mL)
a0	0	1.3	1.2	100	0
a1	0.125	1.3	1.2	100	0.0025
a2	0.25	1.3	1.2	100	0.005
a3	1.0	1.3	1.2	100	0.02
a4	4.0	1.3	1.2	100	0.08
a5	8.0	1.3	1.2	100	0.16

表 2 6 种 VB₁₂ 标准曲线工作液的制备方式
Table 2 Preparation methods of 6 kinds of standard curve working solutions of VB₁₂

实验分组	VB ₁₂ 标准曲线工作液	标准曲线工作液中偏重亚硫酸钠的质量浓度/(mg/mL)
A0	c0	0
A1	c1	0.0025
A2	c2	0.005
A3	c3	0.02
A4	c4	0.08
A5	c5	0.16

表 3 偏重亚硫酸钠对不同样品提取的影响实验分组
Table 3 Group of experiments of the effect of sodium metabisulfite on the extraction of different samples

实验分组	偏重亚硫酸钠添加情况						
	VB ₁₂ 工作液	1849A	奶粉 1	奶粉 2	牛奶 1	牛奶 2	牛奶 3
B1	无(A0)						
B2	无(A0)			10 mL a3 缓冲液			
B3	有(A3)			10 mL a3 缓冲液			

1.3.4 数据处理

根据 GB 5413.14—2010 规定的操作方法灭菌、接种、

培养以及利用紫外分光光度计测定结果,最后利用 Graph Pad prism 5.0 处理数据。

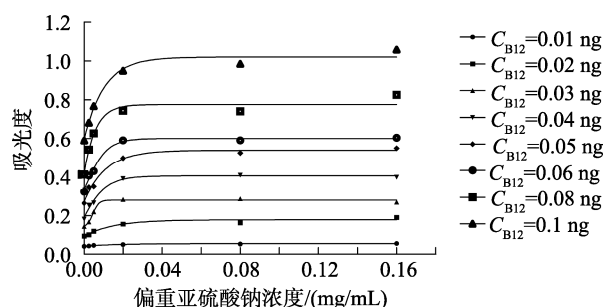
2 结果与分析

2.1 偏重亚硫酸钠浓度对莱士曼氏乳杆菌生长率的影响

根据微生物法测定婴幼儿食品和乳品中 VB₁₂ 的原理,本研究以吸光度的变化趋势来评价偏重亚硫酸钠对莱士曼氏乳杆菌的生长率的影响。在标准曲线管中 VB₁₂ 标准品的含量值为 0.01~0.1 ng 条件下,偏重亚硫酸钠与其对应的吸光度平均值(n=3)关系如图 1 所示。

表 4 不同添加量对样品提取影响的实验分组
Table 4 Groups of experiments of the effects of different additions on sample extraction

实验分组	VB ₁₂ 工作液	1849A	牛奶 1	牛奶 2	牛奶 3	最终溶液中偏重亚硫酸钠的质量浓度/(mg/mL)
C0	b0		10mL, a0			0
C1	b1		10 mL, a1			0.0025
C2	b2		10 mL, a2			0.005
C3	b3		10 mL, a3			0.02
C4	b4		10 mL, a4			0.08
C5	b5		10 mL, a5			0.16



注: 图中 $C_{B_{12}}$ 表示标准品中 VB₁₂ 含量值。

图 1 不同浓度偏重亚硫酸钠与吸光度值关系曲线图($n=3$)

Fig.1 Relation curves of different concentration sodium metabisulfite and absorbance values ($n=3$)

由图 1 可知, 当偏重亚硫酸钠的质量浓度 <0.02 mg/mL 时, 吸光度呈梯度增加; 当质量浓度 ≥ 0.02 mg/mL 时, 吸光度增长缓慢; 当标准溶液中 VB₁₂ 的绝对量 ≥ 0.02 ng 时, 随着 VB₁₂ 绝对量的增高吸光度值增高的也越明显。这表明在标准溶液中添加质量浓度 0~0.16 mg/mL 的偏重亚硫酸钠可以促进莱士曼氏乳杆菌的生长。这一结果也印证了偏重亚硫酸钠能将不同基因形式的 VB₁₂ 转变成能被莱士曼氏乳杆菌利用的亚硫酸合钴胺素。

2.2 偏重亚硫酸钠对不同样品 VB₁₂ 含量检测的影响

利用标准曲线以及样品的吸光度, 按照国家标准 GB 5413.14—2010 中规定的计算公式进行计算。各组实验样品的检测结果如图 2 所示。

由图 2a 可知, 只有 B3 组 1849A 质控样品结果在给定的范围值 (4.82 ± 0.85) $\mu\text{g}/100$ g 内, 而 B1 组的结果远远低于质控样品给定的范围值下限 ($3.97 \mu\text{g}/100$ g); B2 组则远远高于给定范围值的上限 ($5.67 \mu\text{g}/100$ g), 并且图 2b 也表明 B3 组质控样品 VB₁₂ 含量组内差异较 B1 组更小, 所以 B3 实验组是目前环节的最佳方案。即在标准溶液中添加和待测样品一致的偏重亚硫酸钠, 以消除偏重亚硫酸钠因促进莱士曼氏乳杆菌生长产生的干扰。根据图 2c, 可以观察到 B3 组天然乳品牛奶 1、牛奶 2 和牛奶 3 的检测结果明显均高于 B1 组; 图 2d 中强化类食品奶粉 1 和奶粉 2 也出现了相似的变化趋势。表明偏重

亚硫酸钠不仅能促进莱士曼氏乳杆菌的生长, 同时还会促进样品中原生 VB₁₂ 的提取从而影响检测结果。

2.3 偏重亚硫酸钠浓度对样品中原生 VB₁₂ 提取效果的影响

调节最终溶液中偏重亚硫酸钠的质量浓度分别为 0、0.0025、0.005、0.02、0.08、0.16 mg/mL 时, 偏重亚硫酸钠对天然乳品中原生 VB₁₂ 的含量检测值的影响如图 3 所示。图中各实验组样品检测结果均采用四参数 Logistic 曲线拟合的方程进行计算。

图 3a 显示, 质控样品 1849A 的检测结果除 C0 外, 均在质控样品给定值范围内。图 3b 显示, 在偏重亚硫酸钠添加量为 0~0.005 mg/mL (C0~C2) 时, 天然样品中 VB₁₂ 含量值与偏重亚硫酸钠添加量呈正相关; 在偏重亚硫酸钠添加量为 0.005~0.16 mg/mL (C2~C5) 时, 相对应的天然样品中 VB₁₂ 含量值与偏重亚硫酸钠添加量呈负相关。说明在牛奶这种原生 VB₁₂ 含量很低的未强化天然样品中, 随着偏重亚硫酸钠添加量的增加, 偏重亚硫酸钠对于莱士曼氏乳杆菌生长率的促进作用会逐渐超过对天然牛奶中原生 VB₁₂ 提取率的影响, 即使偏重亚硫酸钠的终含量在标准允许的添加范围内, 也会导致检测结果降低。在 0.0025~0.16 mg/mL 的添加范围内, 偏重亚硫酸钠对强化食品的 VB₁₂ 的检测结果没有影响。

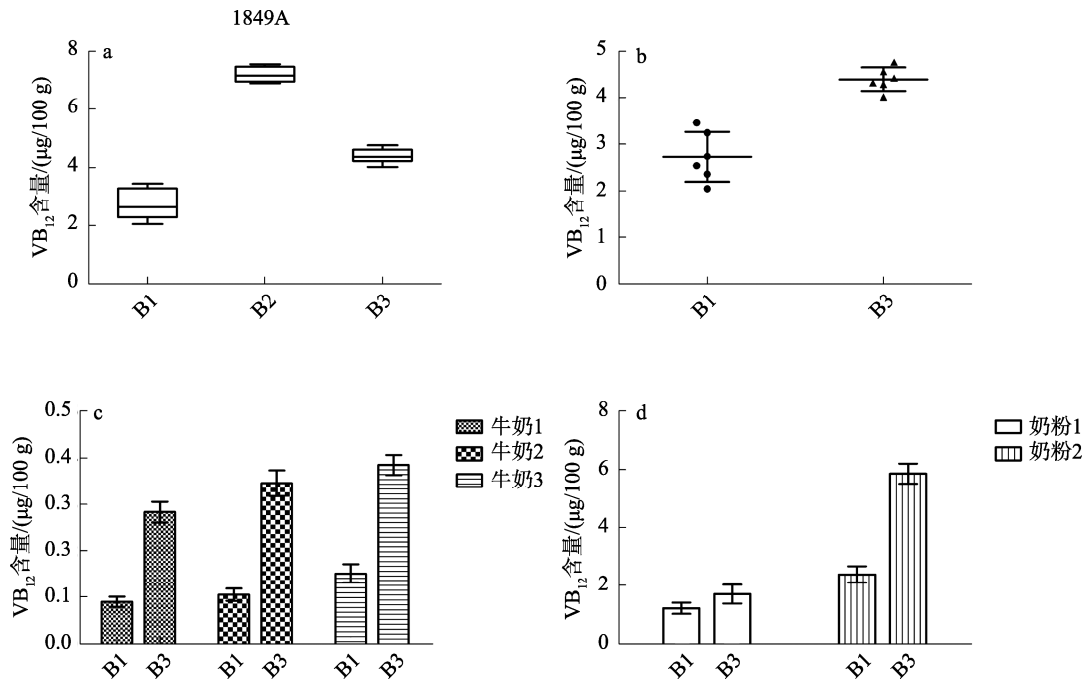
3 结论与讨论

莱士曼氏乳杆菌可以广泛利用各种形式的钴胺素^[20], 培养基营养成分的添加及配比通过影响莱士曼氏乳杆菌的生长直接影响检测结果的准确度, 故 VB₁₂ 培养基的质量控制对整个检测过程至关重要^[21]。本研究发现, 在标准工作液和待测液中添加质量浓度在 0~0.16 mg/mL 范围内的偏重亚硫酸钠可以使质控样品 SRM 1849A 检测值在证书给定值范围内, 进一步提高检测结果的准确度和稳定性。另外, 偏重亚硫酸钠终浓度在 0~0.16 mg/mL 的范围内可以促进莱士曼氏乳杆菌的生长, 同时发现, 在 0~0.05 mg/mL 的范围内, 随偏重亚硫酸钠质量浓度增加, 原生 VB₁₂ 的提取会成比例增加。曾有研究^[22]用微生物法

测定乳酸菌代谢物中 VB₁₂ 影响因素时发现, 当偏重亚硫酸钠的质量浓度为 1 mg/mL 时对莱士曼氏乳杆菌有明显的抑制作用, 待测液中偏重亚硫酸钠浓度为 0.1 mg/mL 时无影响, 与本研究偏重亚硫酸钠的浓度为 0~0.16 mg/mL 时对莱士曼氏乳杆菌的生长促进作用结果并不一致, 事实上, 所提文献中研究基质复杂, 其中是否存在其他影

响莱士曼氏乳杆菌的生长的物质有待进一步验证^[22]。

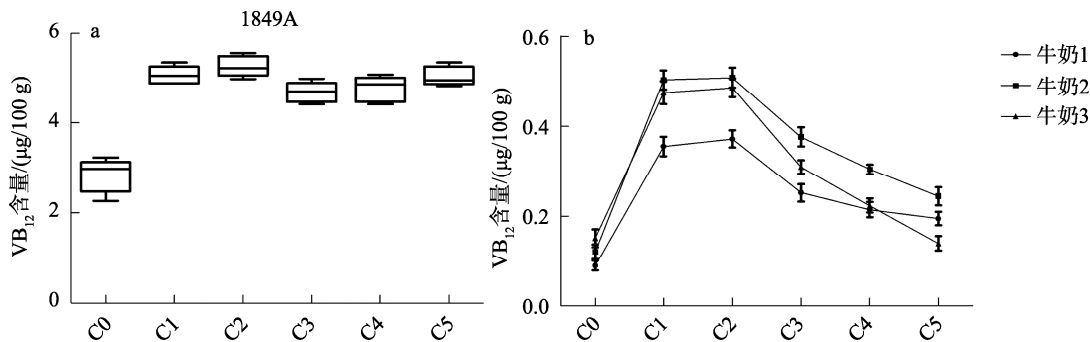
GB 5413.14—2010 的适用范围仅是婴幼儿食品和乳品的检测, 本研究目前也主要针对婴幼儿配方奶粉进行一些相关研究, 后续扩大研究范围到高淀粉含量的谷物类, 亦或动物蛋白含量高的肉类等, 期望为相关标准的制定或修订提供足够的实验数据支持, 扩大标准的适用范围。



注: a: 1849A 质控样品结果; b: 1849A 质控样品组内差异; c: 3 种天然乳品样品结果; d: 2 种强化类食品样品结果。

图2 偏重亚硫酸钠对不同样品 VB₁₂ 检测的影响(n=3)

Fig.2 Effect of sodium metabisulfite on the detection of VB₁₂ in different samples (n=3)



注: a: 质控样品 1849A 的检测结果; b: 3 种天然乳品中原生 VB₁₂ 的含量; C0~C5 中偏重亚硫酸钠添加量分别为 0、0.0025、0.005、0.02、0.08、0.16 mg/mL。

图3 偏重亚硫酸钠浓度对样品中原生 VB₁₂ 提取效果的影响(n=3)

Fig.3 Effect of the concentration of sodium metabisulfite on the extraction effect of native VB₁₂ in the sample (n=3)

参考文献

- [1] 黄娟, 卢沛明. 免疫亲和-HPLC 法测定婴幼儿配方乳粉中维生素 B₁₂[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(11): 71-73.
HUANG J, LU PM. Determination of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by immunoaffinity column-high performance liquid chromatography [J]. Food Nutr China, 2015, 21(11): 71-73.

- [2] 关海滨, 罗素琴, 包小妹, 等. 鼠李糖乳杆菌促生长因子的研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(S1): 42-45, 48.
GUAN HB, LUO SQ, BAO XM, et al. Study on the growth-promoting factors of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. J Inner Mongolia Med Univ, 2013, 35(S1): 42-45, 48.

- [3] 王华, 陈辉, 李雪梅, 等. 维生素 B₁₂ 功能及营养作用研究[J]. 中国食物与营养, 2007, (2): 57-58.
WANG H, CHEN H, LI XM, *et al.* Research on the function and nutrition of vitamin B₁₂ [J]. Food Nutr China, 2007, (2): 57-58.
- [4] 何文, 李非非, 马业菲, 等. 液相色谱法测定奶粉中维生素 B₁₂ 的研究[J]. 山东化工, 2019, 48(23): 97-100.
HE W, LI FF, MA YF, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in milk powder by liquid chromatography [J]. Shandong Chem Ind, 2019, 48(23): 97-100.
- [5] 王永芳, 韩宏伟, 赵馨, 等. 光黄素荧光法测定保健食品中的维生素 B₁₂ 的方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(2): 20-22.
WANG YF, HAN HW, ZHAO X, *et al.* Study on the determination of vitamin B₁₂ in health food by photophanthin fluorescence method [J]. Chin J Food Hyg, 2000, 12(2): 20-22.
- [6] 顾娅楠, 战虎. 液相色谱法测定固体饮料中维生素 B₁₂ 的含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 16: 149-152.
GU YN, ZHAN H. Determination of vitamin B₁₂ in solid beverages by liquid chromatography [J]. Food Re Dev, 2018, 16: 149-152.
- [7] 潘拾朝, 黄康惠, 张喜金, 等. 液相色谱-串联质谱法测定咀嚼片中 B₁₂ 含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3038-3044.
PAN SC, HUANG KH, ZHANG XJ, *et al.* Determination of B₁₂ content in chewable tablets by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(8): 3038-3044.
- [8] 李贻, 王晓洁, 卞菲菲, 等. 高效液相色谱法检测婴幼儿配方食品中维生素 B₁₂ 的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3306-3312.
LI Y, WANG XJ, BIAN FF, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ content in infant formula foods by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(8): 3306-3312.
- [9] 李江, 蔡艳, 田秀梅, 等. 酶联免疫法检测婴幼儿配方奶粉中的维生素 B₁₂[J]. 食品工业, 2017, (8): 250-252.
LI J, QI YA, TIAN XM, *et al.* Detection of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Ind, 2017, (8): 250-252.
- [10] 安崇文, 李海霞, 孟群, 等. 顺磁性微粒子化学发光免疫分析法检测血清维生素 B₁₂ 的性能评价[J]. 中国免疫学杂志, 2014, (11): 1508-1513.
AN CW, LI HX, MENG Q, *et al.* Performance evaluation of paramagnetic microparticle chemiluminescence immunoassay for detection of serum vitamin B₁₂ [J]. Chin J Immun, 2014, (11): 1508-1513.
- [11] 符纯愿, 郑晓华, 林涵梅, 等. 食品中维生素 B₁₂ 微生物检测法中测试菌液的制备方法探讨[J]. 现代食品, 2019, (17): 124-125, 128.
FU CY, ZHENG XH, LIN HM, *et al.* Discussion on the preparation method of the test bacteria liquid in the microbial detection method of vitamin B₁₂ in food [J]. Mod Food, 2019, (17): 124-125, 128.
- [12] HELRICH K, SCOTT PM. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists [J]. Soil Sci Soc Am J, 1971, 35(5). DOI: 10.2136/SSSAJ1971.03615995003500050003X.
- [13] 严家俊, 吴思敏, 苏妙仪, 等. 微生物法测定婴幼儿乳粉中 VB₁₂ 的优化研究[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 304-308.
YAN JJ, WU SM, SU MY, *et al.* Optimization of determination of VB₁₂ in infant milk powder by microbiological method [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(5): 304-308.
- [14] 李全霞, 崔亚娟, 赵寅菲, 等. 微生物法测定食品中水溶性维生素的原理及进展[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 338-344.
LI QX, CUI YJ, ZHAO YF, *et al.* The principle and progress of microbiological methods for the determination of water-soluble vitamins in foods [J]. Food Sci, 2013, 34(13): 338-344.
- [15] AHMADI F, LEE WH, OH YK, *et al.* Fruit and vegetable discards preserved with sodium metabisulfite as a high-moisture ingredient in total mixed ration for ruminants: Effect on *in vitro* ruminal fermentation and *in vivo* metabolism [J]. Asian Austral J Anim, 2020, 33(3). DOI: 10.5713/ajas.19.0596.
- [16] ABDULBASET ES. Effective sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅), HCl, sulfur and distilled water for the removal of Pb, Zn and Cr contaminated soil in the columns method [J]. Agric Sci, 2019, 10(7): 882-892.
- [17] AUSTIN L, MANOJA U, JOHN K, *et al.* Differentiation of sickle cell zygosity utilizing a sodium metabisulfite method [J]. FASEB J, 2019, 33(S1): 636.7.
- [18] SHAWK DJ, DRITZ SS, GOODBAND RD, *et al.* Effects of sodium metabisulfite additives on nursery pig growth [J]. Transl Anim Sci, 2019, 3(1): 103-112.
- [19] 刘萍, 晏涛, 郇娟, 等. 莱士曼氏乳杆菌用于检测食品中 VB₁₂ 的特性分析的研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 295-299.
LIU P, YAN T, LI J, *et al.* Research progress in the analysis of characteristics of *Lactobacillus manseri* in the detection of VB₁₂ in food [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(9): 295-299.
- [20] MUHAMMAD K, BRIGGS D, JONES G. The appropriateness of using cyanocobalamin as calibration standards in *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 assay of vitamin B₁₂ [J]. Food Chem, 1993, 48(4): 427-429.
- [21] 杨文炼, 李倩, 李树垚, 等. 培养基质量控制对维生素 B₁₂ 含量测定的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3346-3351.
YANG WL, LI Q, LI SY, *et al.* Influence of culture medium quality control on the determination of vitamin B₁₂ content [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(8): 3346-3351.
- [22] 唐雯. 微生物法测定乳酸菌代谢物中 VB₁₂ 影响因素的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
TANG W. Study on the influence factors of VB₁₂ in lactic acid bacteria metabolites determined by microbiological method [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015.

(责任编辑: 郑丽)

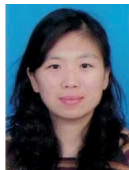
作者简介



杨亚芳, 主要研究方向为微生物学检测。
E-mail: f18801064314@163.com



李倩, 硕士, 主要研究方向为食品微生物学检测、分子生物学。
E-mail: 2290898298@qq.com



蔡雪凤, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物学检测、分子生物学检测。
E-mail: caixuefeng@mail.beijing.gov.cn