

天然燕麦中维生素 B₁₂ 的测定中 2 种微生物法 前处理方式的比较

王志伟, 徐 琼, 陈欣钦, 曲勤凤*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 研究使用微生物法对燕麦中维生素 B₁₂ 测定的可行性。**方法** 以国标法为基础, 采用标准前处理方式和添加淀粉酶的前处理方式分别对 6 份燕麦中的维生素 B₁₂ 进行测定, 比较 2 种不同前处理方式对检测结果的影响。**结果** 国标法测定的标准曲线在维生素 B₁₂ 的浓度为 0.01~0.1 ng 范围内具有良好的线性关系 ($r^2=0.995$)。前处理过程中加入 20 mL 浓度为 1% 的 α -淀粉酶溶液可充分提取出燕麦样品中的维生素 B₁₂。标准处理法的最大相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 10.2%, 酶解处理法最大 RSD 为 8.83%。**结论** 对于燕麦中维生素 B₁₂ 的测定, 酶解处理法有更好的适用性, 检测结果更为可靠。

关键词: 维生素 B₁₂; 微生物法; 天然燕麦; 酶解处理

Comparison of 2 kinds of microbial pretreatment methods for the determination of vitamin B₁₂ in natural oat

WANG Zhi-Wei, XU Qiong, CHEN Xin-Qin, QU Qin-Feng*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To research the feasibility of the determination of vitamin B₁₂ using microbial method. **Methods** On the basis of national standard method, the vitamin B₁₂ content in 6 oat samples was determined by standard pre-treatment method and adding amylase before treatment, comparing the effect of 2 different pretreatment methods on the results. **Results** The standard curve of vitamin B₁₂ by national standard method had a good linear relationship in the range of 0.01~0.1 ng with r^2 was 0.995. The vitamin B₁₂ in oat samples could be extracted fully by adding 20 mL alpha amylase solution whose concentration was 1% in the process of pretreatment. The maximum relative standard deviation (RSD) of the standard treatment method was 10.2%, and the maximum RSD of enzymatic hydrolysis was 8.83%. **Conclusion** Enzyme treatment method has better applicability, and the test results are more reliable For the determination of vitamin B₁₂ in natural oat.

KEY WORDS: vitamin B₁₂; microbiological method; natural oat; digestion process

1 引言

维生素 B₁₂(cyanocobalamin)又称氰钴氨素, 也称为动

物蛋白因子, 是一类含有类似氰钴氨素的维生素活性物质的总称。它是唯一含有金属离子的水溶性维生素, 又是人体必需的维生素之一^[1]。人体自身不能合成维生素 B₁₂, 只

基金项目: 上海市食品质量安全检测与评价专业技术服务平台(15DZ2292500)

Fund: Supported by the Professional Technical Service Platform for Food Quality and Safety Testing and Evaluation of Shanghai (15DZ2292500)

*通讯作者: 曲勤凤, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: quqf@sqi.org.cn

*Corresponding author: QU Qin-Feng, Master, Senior Engineer. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: quqf@sqi.org.cn

能从外源性食物、药物或保健食品中摄取^[2]。维生素 B₁₂ 缺乏时, 主要影响人体的造血系统和神经系统。通过对其生理功能的研究可知, 维生素 B₁₂ 是人体一种重要的营养素, 参与体内多种代谢, 还可有效预防恶性贫血、老年痴呆和抑郁症等疾病, 对保持人类身体健康起着重要作用^[3,4]。

目前, 测定维生素 B₁₂ 的方法主要有分光光度法、原子吸收法^[5]、微生物法及高效液相色谱法^[6,7]等, 国内采用高效液相色谱法测定维生素 B₁₂ 多用于高含量的样品(如复合添加剂、药物、保健品等)^[8,9]。由于天然燕麦中维生素 B₁₂ 的含量较低, 而微生物分析方法是利用微生物对维生素 B₁₂ 具有的特异性和灵敏性定量测定出样品中的维生素 B₁₂ 含量。微生物法对于维生素含量较低、基质较复杂^[10]的样品具有较高的灵敏度和精确度^[11]。目前, 微生物法仍为国际官方机构测定维生素 B₁₂ 的首选认可方法^[12]。本研究主要参照国标法^[13], 采用标准前处理和添加淀粉酶前处理 2 种不同方式对天然燕麦中维生素 B₁₂ 含量进行测定比较, 分析探讨运用微生物法测定天然燕麦中维生素 B₁₂ 含量的可行性。

2 材料与方法

2.1 菌株和试剂

莱氏曼士乳酸杆菌(*Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830); α -淀粉酶(1.5 U/mg)(美国 Sigma 公司); 乳酸杆菌琼脂培养基、乳酸杆菌肉汤培养基、维生素 B₁₂ 测定用培养基(美国 BD 公司); 维生素 B₁₂ 标准品(纯度 \geq 99.0%, 美国 SUPELCO 公司); 天然燕麦(美国桂格公司)。

2.2 主要设备

GI6-2 电热恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司); Seven Easy 酸度计(瑞士梅特勒-托利多公司); Uv-1800 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Merck Millipore 超纯水机(美国 Millipore 公司); Thermo 离心机(赛默飞世尔公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品处理

(1) 标准处理法

每份燕麦样品称取 10 g 于 250 mL 烧杯中, 加 10 mL 前处理液, 再加入适量水, 于 121 °C 水解 10 min, 冷却后调 pH 值至 4.5 \pm 0.2, 再用水定容至 250 mL。滤纸过滤, 保存滤液于冰箱内, 备用。使用前将滤液适当稀释, 使最终待测液中维生素 B₁₂ 的质量浓度在 0.01~0.02 ng/mL 为宜。

(2) 酶解处理法

每份燕麦样品称取 10 g 于 250 mL 烧杯中, 加 10 mL 前处理液, 再加入适量水, 于 121 °C 水解 10 min, 冷却后加入 α -淀粉酶溶液(浓度为 1%), 于 36 °C \pm 1 °C 保温 18 h 后, 于 100 °C 水浴加热 5 min。冷却后调 pH 值至 4.5 \pm 0.2, 再用水定容至 250 mL。滤纸过滤, 保存滤液于冰箱内备用。

使用前将滤液适当稀释, 使最终待测液中维生素 B₁₂ 的质量浓度在 0.01~0.02 ng/mL 为宜。

2.3.2 接种液的制备

使用前一天, 将莱氏曼士乳酸杆菌菌种由储备菌种管移种于已灭菌的乳酸杆菌肉汤培养基中, 在 36 °C \pm 1 °C 的恒温箱中培养 18~24 h, 取出离心 3 min (2000 r/min), 弃去上清液, 用已灭菌的生理盐水淋洗 3 次, 再加入灭菌过的生理盐水, 混匀, 使菌种成为混悬体。吸取适量该菌悬液于 10 mL 生理盐水中, 混匀制成测试菌液。

用分光光度计, 以生理盐水做空白, 于 550 nm 波长下测试菌液的透光率, 使其透光率在 60%~80%之间。

2.3.3 标准曲线的绘制

精确称取维生素 B₁₂ 标准品 10 mg, 使用 25%乙醇溶液定容至 1000 mL 容量瓶中, 维生素 B₁₂ 浓度为 10 μ g/mL, 此为维生素 B₁₂ 贮备液。吸取 5 mL 贮备液于 500 mL 容量瓶中, 使用 25%乙醇溶液定容至 500 mL, 维生素 B₁₂ 浓度为 100 ng/mL, 此为维生素 B₁₂ 中间液。吸取 5 mL 维生素 B₁₂ 中间液于 500 mL 容量瓶中, 使用 25%乙醇溶液定容至 500 mL, 维生素 B₁₂ 浓度为 1 ng/mL, 此为维生素 B₁₂ 工作液。分别吸取 5 mL 工作液于 250 mL 和 500 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。低浓度标准溶液的浓度为 0.01 ng/mL, 高浓度标准溶液的浓度为 0.02 ng/mL。按顺序加入超纯水、标准曲线工作液和维生素 B₁₂ 测定用培养基, 每个试管号的样品在 3 只试管中重复制备 3 次。标准曲线的制作见表 1。

表 1 维生素 B₁₂ 国标法标准曲线的制作

Table 1 Production of standard curve of vitamin B₁₂ by national standard method

试管号	水(mL)	低浓度标准溶液(mL)	高浓度标准溶液(mL)	培养基(mL)
S1	5	0	0	5
S2	5	0	0	5
S3	4	1	0	5
S4	3	2	0	5
S5	2	3	0	5
S6	1	4	0	5
S7	0	5	0	5
S8	2	0	3	5
S9	1	0	4	5
S10	0	0	5	5

2.3.4 样品的准备

按顺序加入水、样品溶液和维生素 B₁₂ 测定用培养基, 每个试管号的样品在 3 只试管中重复制备 3 次。各成分的加入量见表 2。

表 2 试样管制备
Table 2 Preparation of sample test tubes

试管号	水(mL)	样品溶液(mL)	培养基(mL)
S1	4	1	5
S2	3	2	5
S3	2	3	5
S4	1	4	5

2.3.5 接种与培养

将标准曲线管和试样管于 121 °C 灭菌 5 min, 取出后快速冷却。每管接种 50 μL 测试菌液(其中标准曲线管中空白 S1 除外), 于 36 °C±1 °C 恒温箱中培养 19~20 h。

2.3.6 结果测定和计算

以标准管的接种空白 S2 调零, 在 550 nm 下测定各试管的吸光度(A)。以标准管维生素 B₁₂ 所含的浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。样品中维生素 B₁₂ 的含量按下式计算:

$$X = \frac{Cx}{m} \times \frac{f}{1000} \times 100$$

式中: X 为试样中维生素 B₁₂ 的含量, 单位为 μg/100 g; Cx 为试样提取液中维生素 B₁₂ 含量的平均值, 单位为 ng; m 为试样的质量, 单位为 g; f 为稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

以维生素 B₁₂ 含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 如图 1 所示。国标法测得的维生素 B₁₂ 含量为 0.01~0.1 ng 时, 标准曲线的线性关系良好, 回归方程为 $Y=4.6446X+0.0511$, $r^2=0.995$ (图 1)。

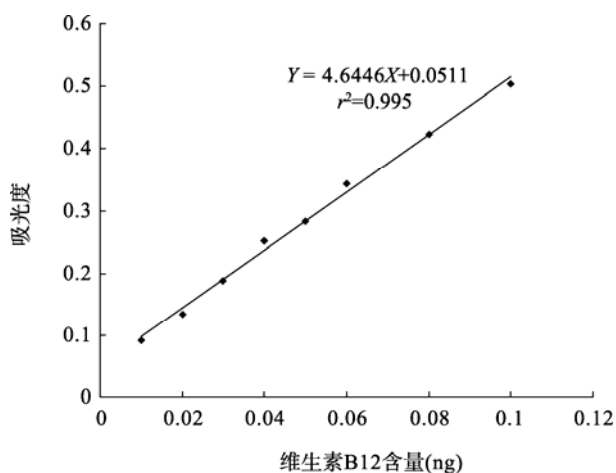


图 1 国标法标准曲线

Fig. 1 Standard curve of national standard method

3.2 检测结果比较

3.2.1 酶解液添加量对样品检测结果的影响

具有生物活性的维生素才可以被人或动物吸收利用,

而微生物法正是利用莱氏曼士乳酸杆菌的生长对维生素 B₁₂ 具有特异性的原理, 通过微生物的生长来测定样品中维生素 B₁₂ 的含量。本研究总体上按照国标检测方法, 前处理过程增加了酶解法处理。

选取 1 份天然燕麦样品, 按照国标法进行测试, 使用酶解前处理法操作。样品中均未额外添加强化维生素 B₁₂, 所测定的为样品中天然维生素 B₁₂ 的含量。通过对不同酶解液添加量对天然样品中维生素 B₁₂ 提取效果的研究, 发现当酶解液添加量为 2~20 mL 时, 样品中维生素 B₁₂ 的检测结果也随之提高; 当酶解液添加量超过 20 mL 时, 样品中维生素 B₁₂ 的检测结果变化不大, 说明酶解液添加量的增加确实有助于样品中维生素 B₁₂ 的提取。测定结果见表 3 (同一样品平行测定 3 次)。

表 3 天然燕麦中维生素 B₁₂ 含量的检测结果(n=3)
Table 3 Test results of vitamin B₁₂ content in natural oats (n=3)

样品编号	酶解液添加量 (mL)	维生素 B ₁₂ 含量 (μg/100 g)	\bar{x}	SD	RSD(%)
1-1		0.13			
1-2	2	0.15	0.13	0.0153	11.80
1-3		0.12			
1-1		0.16			
1-2	5	0.18	0.17	0.0115	6.76
1-3		0.16			
1-1		0.19			
1-2	10	0.18	0.19	0.0058	3.05
1-3		0.19			
1-1		0.26			
1-2	20	0.25	0.26	0.0153	5.88
1-3		0.28			
1-1		0.26			
1-2	25	0.27	0.27	0.0058	2.15
1-3		0.27			
1-1		0.28			
1-2	30	0.27	0.27	0.0153	5.67
1-3		0.25			

3.2.2 不同处理方法对样品检测结果的影响

选取 6 份天然燕麦样品, 按照国标法进行测试, 使用 2 种处理方式, 一种按照标准处理法操作, 另一种按照酶解处理法操作(样品前处理过程中加入 20 mL α-淀粉酶溶液)。样品中均未额外添加强化维生素 B₁₂, 所测定的为样品中天然维生素 B₁₂ 含量。检测结果见表 4 (为比较不同处理方法之间的稳定性差异, 同一样品平行测定 3 次)。

表 4 不同处理法对天然燕麦中维生素 B₁₂ 含量的检测结果($n=3$)
Table 4 Vitamin B₁₂ content in natural oats processed by different methods ($n=3$)

样品编号	标准处理法($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	\bar{x}	SD	RSD(%)	酶解处理法($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	\bar{x}	SD	RSD(%)
1-1	0.11				0.27			
1-2	0.13	0.12	0.0115	9.58	0.26	0.27	0.0153	5.67
1-3	0.11				0.29			
2-1	0.28				0.51			
2-2	0.28	0.28	0.0058	2.07	0.55	0.53	0.0200	3.77
2-3	0.27				0.53			
3-1	0.17				0.39			
3-2	0.15	0.16	0.0100	6.25	0.38	0.38	0.0100	2.63
3-3	0.16				0.37			
4-1	0.22				0.46			
4-2	0.21	0.22	0.0058	2.64	0.44	0.46	0.0252	5.48
4-3	0.22				0.49			
5-1	0.23				0.5			
5-2	0.23	0.24	0.0173	7.21	0.53	0.51	0.0208	4.08
5-3	0.26				0.49			
6-1	0.13				0.27			
6-2	0.15	0.15	0.0153	10.2	0.32	0.30	0.0265	8.83
6-3	0.16				0.31			

用 2 种前处理方法对 6 份天然燕麦中维生素 B₁₂ 含量分别进行检测。2 种前处理方法检测结果均较为稳定, 标准处理法最大 RSD 为 10.2%, 酶解处理法最大 RSD 为 8.83%。但是需要注意的是, 酶解处理法的检测结果均明显高于标准处理法的检测结果。由于天然燕麦样品中维生素 B₁₂ 含量较低, 因此在测试时需要称取较多量的样品, 这样会导致样品高温高压水解后变的相当粘稠, 不利于天然样品中维生素 B₁₂ 的提取。通过加入酶解液处理, 可以有效降低样品粘度, 充分提取其中的维生素 B₁₂。

在检测过程中, 菌种的活力和纯度对实验结果有非常大的影响, 应严格按照要求进行菌种活化, 注意无菌操作, 避免污染。尤其是用到的玻璃器皿, 在使用前必须用稀盐酸或重铬酸钾洗液浸泡, 这种洗液在实验室内使用最广泛^[14], 之后用纯水清洗干净后于 200 °C 烘干 2 h, 以除去微量生长因子的影响。

4 结 论

微生物方法以其高灵敏度和可靠性已得到国际权威机构的认可^[15]。因此对于天然燕麦样品, 运用微生物方法测定具有优势。本研究通过比较微生物方法中对于样品的

2 种前处理方式, 探讨使用微生物法测定天然燕麦中维生素 B₁₂ 的可行性。研究发现, 相对于国标中的标准处理法, 酶解处理法更为适合。由于天然燕麦中维生素 B₁₂ 的含量相对较低, 检测时需要称取的样品量较大, 加入酶解液可以有效降低样品粘度, 更有效、彻底地将天然燕麦中的维生素 B₁₂ 提取出来, 并且微生物方法的灵敏度较高, 检出限低, 适合天然燕麦中维生素 B₁₂ 的测定。

参考文献

- [1] 钟耀广. 功能性食品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
Zhong YG. Functional food [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [2] 王赢, 袁辰刚, 谢小钰, 等. 微孔板式微生物法快速测定婴儿奶粉中维生素 B₁₂ 的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 269.
Wang Y, Yuan CG, Xie XY, et al. Study on rapid determination of vitamin B₁₂ in infant milk powder by microporous plate method [J]. Food Ind, 2015, 36(6): 269.
- [3] 徐亲民. 维生素 B₁₂ 的医疗保健作用[J]. 国外医药: 合成药·生化药制剂分册, 1998, (2): 97.
Xu QM. Medical health care function of vitamin B₁₂ [J]. Foreign Med: Synthe Med-Biochem Med-Preparat Booklet, 1998, (2): 97.
- [4] 赵永飞, 蒋雨平. 钴胺代谢与钴胺 C 病[J]. 中国临床神经科学, 2004, 12(40): 402.

- Zhao YF, Jiang YP. Cobalt amines metabolism and cobalt amine C disease [J]. *Chin Clin Neurosci*, 2004, 12(40): 402.
- [5] 李海涛, 汤黎, 于村, 等. 浊点萃取-原子吸收法间接检测食品中维生素 B₁₂ 方法的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(7): 821-822.
- Li HT, Tang Y, Yu C, *et al.* Study on the method of indirect detection of vitamin B₁₂ in food by atomic absorption cloudpoint extraction [J]. *Chin J Health Inspect*, 2005, 15(7): 821-822.
- [6] 鲁杰, 杨大进, 王竹天. 固相萃取-高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B₁₂ 的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(4): 324-328.
- Lu J, Yang DJ, Wang ZT. Determination of vitamin B₁₂ in health foods by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Food Hyg*, 2004, 16(4): 324-328.
- [7] 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 Y, *et al.* Simultaneous determination of 8 water-soluble vitamins in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2008, 27(4): 408-411.
- [8] 林宏琳, 华永有, 黄宏男. 液相色谱-质谱串联法测定保健食品中维生素 B₁₂[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(5): 432-434.
- Lin HL, Hua YY, Huang HN. Determination of vitamin B₁₂ in health food series method by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2011, 23(5): 432-434.
- [9] 郭兴会, 王丽丽, 仪宏. HPLC 法有效测定发酵液中维生素 B₁₂ 的含量[J]. *中国食品添加剂*, 2009, (1): 152-156.
- Guo XH, Wang LL, Yi H. Determination of the content of vitamin B₁₂ in fermented liquid effectively by HPLC [J]. *China Food Addit*, 2009, (1): 152-156.
- [10] 张丽宏, 王克新, 王森, 等. 微生物法测定乳粉中维生素 B₁₂ 的应用和探讨[J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(10): 58-60.
- Zhang LH, Wang KX, Wang M, *et al.* Application and discussion for the determination of vitamin B₁₂ in milk powder by microbiological method [J]. *China's Dairy Ind*, 2008, 36(10): 58-60.
- [11] Gregory ME. The microbiological assay of vitamin B₁₂ in the milk of different animal species [J]. *British J Nutrit*, 1954, (8): 340-347.
- [12] 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.* Study on rapid determination of vitamin B₁₂ in food by microbiological method [J]. *China's Dairy Ind*, 2014, (148): 42-44.
- [13] 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[S].
- GB 5413.14-2010 National food safety standards Determination of vitamin B₁₂ in infant food and milk products [S].
- [14] 夏玉宇. 化学实验室手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- Xia YY. *The chemistry lab manual* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.
- [15] 鲁盛静, 田野. 婴幼儿食品和乳制品中维生素 B₁₂ 测定的探讨[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(2): 50-55.
- Lu SJ, Tian Y. Determination of vitamin B₁₂ in infant food and dairy products [J]. *China Dairy Ind*, 2013, 41(2): 50-55.

(责任编辑: 刘 丹)

作者简介

王志伟, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: wangzw@sqi.org.cn

曲勤凤, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: quqf@sqi.org.cn