

微孔板法检测婴幼儿配方乳粉中 维生素 B₁₂ 的含量

王晶*, 王红丹, 芦云, 李玲

(中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

摘要: **目的** 建立用微孔板检测婴幼儿配方乳粉中维生素 B₁₂ 的方法。**方法** 基于微生物原理的检测方法, 缩小样品的培养体积。样品经提取后, 分装到 96 孔细胞培养板中, 在培养基中加入 0.05% 的菌悬液, 混匀后分配到含有样品和标准品的微孔中, 培养后直接用酶标仪测定吸光度值。**结果** 本方法标准曲线相关系数 0.9987, 加标回收实验回收率在 92.7%~98.7% 之间, 重复性实验相对标准偏差在 1.03%~1.73% 之间, 6 种不同含量的样品同时用 GB 5413.14-2010 方法和本方法检测维生素 B₁₂, 检测结果无显著性差异。**结论** 该方法快速, 操作简单, 稳定性高, 检测成本低, 可大批量样品同时检测, 适合测定婴幼儿配方乳粉中维生素 B₁₂ 的含量。

关键词: 维生素 B₁₂; 微孔板; 配方乳粉

Detection of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by microporous plate method

WANG Jing*, WANG Hong-Dan, LU Yun, LI Ling

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for detection of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by microporous plate. **Methods** Based on the principle of microbial detection methods, reduce the training volume of the sample. The samples were extracted and packed into a 96-well cell culture plate, added 0.05% bacterial suspension to the B₁₂ assay medium, after mixing, it was distributed to micropores containing samples and standard, after culture, the absorbance value was determined by enzyme standard instrument. **Results** The standard curve correlation coefficient was 0.9987, the recovery rates of the method were in the range of 92.7%~98.7%, the relative standard deviations of repetitive experiments were in the range of 1.03%~1.73%, six samples of different content were simultaneously tested with GB 5413.14-2010 method and this method for vitamin B₁₂, there was no significant difference in the test results. **Conclusion** The method is rapid, easy to operate, high stability, low detection cost, easy to detect large quantities of samples at the same time, suitable for the determination of vitamin B₁₂ content in infant formula milk powder.

KEY WORDS: vitamin B₁₂; microporous plate; infant formula

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2018JK035)

Fund: Supported by Chinese Academy of Inspection and Quarantine Basic Research Business Fee Project (2018JK035)

*通讯作者: 王晶, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangjing@caiqtest.com

*Corresponding author: WANG Jing, Senior Engineer, Chinese Academy of Inspection and Quarantine Comprehensive Test Center, No.3, Gaobeidian North-Road, Beijing 100123, China. E-mail: wangjing@caiqtest.com

1 引 言

维生素 B₁₂ 是自然界中唯一含有金属元素的咕啉类化合物的总称, 分子中心含有金属钴原子故又被称为钴胺素^[1]。维生素 B₁₂ 有 5 种左右的类似物, 根据分子中与钴连接的基团不同, 通常分为羟基钴胺素(hydroxy cobalamin), 水钴胺素(aqua cobalamin), 氰基钴胺素(cyanocobalamin), 脱氧腺苷钴胺素(deoxy adenosyl cobalamin)和甲基钴胺素(methyl cobalamin)^[2]。其中氰基钴胺素非天然存在形式, 是工业提纯过程中用氰化物代替天然钴胺素而得到的产物^[3]。人体自身不能合成维生素 B₁₂, 外源食物主要来源于动物类食物, 天然乳含量很低, 植物性食品中基本不含维生素 B₁₂^[4]。目前应用在医药、食品和饲料中的维生素 B₁₂ 多为氰基钴胺素^[5], 已被广泛地应用于医药、保健食品, 强化营养食品, 尤其是婴幼儿配方食品中^[6]。

维生素 B₁₂ 是人体必需的维生素之一, 它能促进人体血液循环中红细胞的发育和生长, 并参与 DNA 的合成, 调节神经系统和人体内细胞代谢等^[7]。对于婴幼儿来讲, 维生素 B₁₂ 会影响其身体发育, 若摄入不足, 会导致维生素 B₁₂ 缺乏症, 表现出情绪异常、爱哭爱闹、反应迟缓及发育不良等一系列症状^[8]。

我国对食品标签有严格的规定, 标准中要求在产品保质期内, 能量和营养成分的实际含量不低于标示值的 80%。维生素 B₁₂ 是乳粉标签的必检项目。维生素 B₁₂ 检测方法主要有免疫分析法、化学发光分析法、高效液相色谱法和微生物法等^[9-11]。其中, 微生物法具有灵敏度高, 检测限低, 可靠性强等优点。我国国家标准 GB 5413.14-2010^[12], 美国药典(United States Pharmacopeia, USP)^[13]和美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)^[14]都将微生物法作为维生素 B₁₂ 测定的主要方法和仲裁方法。但微生物方法操作复杂, 需要使用大量玻璃试管, 增加了工作量和实验的不稳定性。鲁盛静等^[15]应用德国拜发公司的 VitaFast vitam in B₁₂ 试剂盒检测了婴幼儿配方奶粉, 试剂盒法虽然操作简单, 但成本高且耗时长, 需要培养 48 h。为此, 建立一个准确度高, 快速并易于普及的检测方法十分重要。

为了保留微生物原理的传统优点又能简化操作步骤, 提高效率并降低成本。本文研究应用 96 孔微孔板代替玻璃试管对婴幼儿配方奶粉维生素 B₁₂ 进行检测, 用酶标仪代替分光光度计测定结果。以期为婴幼儿配方乳粉中的维生素 B₁₂ 的检测提供参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

XS105 电子天平(梅特勒-托利多公司); G180TW 高压灭菌锅(中国致微公司); MIR-254-PC 培养箱(日本

Panasonic 公司); multiskan go 酶标仪(美国 Thermo 公司); NU-437-600E 生物安全柜(梅特勒-托利多公司); Costar 3590 96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司); Cyclor Seal Sealing Film(美国 Axygen 公司)。

乳酸杆菌琼脂培养基、乳酸杆菌肉汤培养基(北京陆桥公司); 维生素 B₁₂ 测定培养基(美国 BD 公司); 维生素 B₁₂ 标准品, 纯度 98.4%(德国 DR 公司); 莱士曼氏乳酸杆菌(ATCC7830)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

维生素 B₁₂ 标准储备液(100 μg/mL): 精确称取维生素 B₁₂ 标准品 10.2 mg, 用 25%乙醇溶液溶解, 定容至 100 mL。

维生素 B₁₂ 标准中间液(100 ng/mL): 吸取 100 μL 维生素 B₁₂ 标准储备液, 用 25%乙醇溶液稀释, 定容至 100 mL。

维生素 B₁₂ 标准工作液(0.10 ng/mL, 0.05 ng/mL): 吸取 100 μL 维生素 B₁₂ 标准中间液, 用蒸馏水稀释, 定容至 100 mL, 得到 0.10 ng/mL 高浓度标准品工作液; 吸取 50 μL 维生素 B₁₂ 标准中间液, 用蒸馏水稀释, 定容至 100 mL, 得到 0.05 ng/mL 低浓度标准品工作液。

2.2.2 菌悬液的制备

将培养好的莱士曼氏乳酸杆菌种子液振荡混匀, 无菌条件下将种子液转入 15 mL 离心管, 3000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液。再次加入 5 mL 已灭菌的维生素 B₁₂ 测定用培养基, 振荡混匀, 3000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 再加入 5 mL 已灭菌的维生素 B₁₂ 测定用培养基, 混匀制成菌悬液备用。

2.2.3 样品前处理

按照国标 GB 5413.14-2010^[12]方法提取样品, 根据样品中维生素 B₁₂ 含量用水对样品提取液进行适当稀释, 使稀释后样品提取液中维生素 B₁₂ 含量在 0.1~0.05 ng/mL 范围内。

2.2.4 标准品和样品提取液的无菌处理

将配好的维生素 B₁₂ 标准品低浓度工作液、高浓度工作液、稀释后的样品提取液, 于 121 °C 高压灭菌 5 min, 冷却后备用。

2.2.5 微孔板操作

将灭菌后的维生素 B₁₂ 标准品工作液、样品提取液按照表 1 和表 2 分别加入到无菌的 96 孔微孔板中, 每个浓度做 3 个平行。再将含有 0.05%菌悬液的维生素 B₁₂ 测定用培养基加入到微孔中, 每孔加 150 μL, 空白孔加无菌悬液的培养基。

2.2.6 培养及测定

将配制好的微孔板用无菌封口膜覆盖后置于 37 °C 恒温培养箱中培养 22 h。培养后将微孔板充分振荡混匀, 用酶标仪于 550 nm 测吸光度(OD)。

2.2.7 数据统计分析

方法比对实验, 每个样品做 6 次重复, 采用 Excel 软件进行差异性分析。

表 1 维生素 B₁₂ 标准品工作液的配制
Table 1 The preparation of vitamin B₁₂ standard working solution

微孔号	低浓度工作液							高浓度工作液		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
灭菌水/ μL	150	150	120	90	60	30	0	60	30	0
标准溶液/ μL	0	0	30	60	90	120	150	90	120	150
浓度/(ng/mL)	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10

表 2 样品提取液的配制
Table 2 The preparation of sample extract

微孔号	1	2	3	4
灭菌水/ μL	0	75	112.6	131.2
样品测定液/ μL	150	75	37.4	18.8
稀释倍数	400	800	1600	3200

用途配方全营养液和液态奶, 标记为样品 1-样品 6, 分别采用国标法和微孔板法测定维生素 B₁₂ 含量, 结果见表 5。对 2 种检测方法的结果进行配对 t 检验, $t=1.994$, $P=0.710$, $P>0.05$, 2 种方法无显著差异。

表 3 加标回收实验结果
Table 3 The results of recovery test

加标量 /($\mu\text{g}/100\text{g}$)	实际测量值 /($\mu\text{g}/100\text{g}$)	回收率/%	平均回收率/%
	0.10	100	
0.1	0.09	90.0	93.3 \pm 5.77
	0.09	90.0	
	0.48	96.0	
0.5	0.49	90.0	92.7 \pm 3.06
	0.46	92.0	
	0.98	98.0	
1.0	1.01	101	98.7 \pm 2.08
	0.97	97.0	
	1.98	99.0	
2.0	1.94	97.0	98.6 \pm 1.04
	1.97	98.5	
	4.98	99.6	
5.0	4.89	97.8	98.7 \pm 0.90
	4.94	98.8	

3 结果与分析

3.1 标准曲线

以标准曲线微孔中维生素 B₁₂ 标准品浓度为 X 轴, 相对应的吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图, 标准曲线见图 1。维生素 B₁₂ 浓度在 0.00 ~ 0.10 ng/mL, 标准曲线的线性关系良好, $r^2=0.9987$ 。

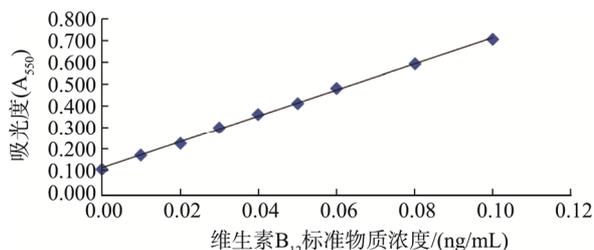


图 1 维生素 B₁₂ 标准曲线

Fig.1 The standard curve of vitamin B₁₂

3.2 加标回收实验

用未添加维生素 B₁₂ 的奶粉为样品进行加标回收实验, 加标浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0 和 5.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。每个加标浓度 3 个平行得到回收率结果, 见表 3。经测定平均回收率范围为 92.7%~98.7%, 平均回收率为(96.4 \pm 3.11)%。

3.3 重复性实验

选取 6 个不同含量不同阶段的配方奶粉, 用微孔板法测定的维生素 B₁₂ 含量, 每个样品做 6 个平行, 结果见表 4。检测结果的 RSD 在 1.03%~1.73%之间。

3.4 方法比对实验

选取婴儿配方奶粉(一段)、较大婴儿配方奶粉(二段)、幼儿配方奶粉(三段)、乳蛋白深度水解配方粉、特殊医学

4 结论

本研究在传统国标法的基础上, 用 96 孔微孔板代替玻璃试管, 降低玻璃试管上油脂、洗涤剂及活性物质等外来因素对菌种的影响, 确保了菌株的稳定性; 降低了培养体积减少了培养基的使用量, 降低了检测成本; 该方法结果重复性和准确度良好, 与国标方法相比, 无显著性差异; 与商品化试剂盒相比, 不仅成本低, 并且缩短了培养时间。本研究方法适合大批量样品检测, 可在乳粉企业和检测机构推行。

表 4 重复性实验结果
Table 4 The results of repeated test

样品号	维生素 B ₁₂ 含量/(μg/100 g)						平均值/(μg/100 g)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
奶粉 1	1.62	1.65	1.64	1.59	1.60	1.62	1.62±0.02	1.41
奶粉 2	2.89	2.90	2.83	2.83	2.91	2.85	2.87±0.04	1.26
奶粉 3	4.64	4.68	4.60	4.72	4.63	4.70	4.64±0.06	1.18
奶粉 4	0.87	0.86	0.90	0.88	0.86	0.88	0.88±0.02	1.73
奶粉 5	1.11	1.09	1.12	1.09	1.10	1.12	1.10±0.01	1.25
奶粉 6	3.66	3.59	3.67	3.60	3.62	3.58	3.62±0.04	1.03

表 5 比对实验结果
Table 5 The results of the comparison

样品	方法	维生素 B ₁₂ 含量/(μg/100 g)						平均值
		1	2	3	4	5	6	
1	试管法	2.43	2.52	2.48	2.48	2.46	2.55	2.49±0.04
	微孔板法	2.40	2.48	2.51	2.46	2.40	2.38	2.44±0.05
2	试管法	3.68	3.75	3.70	3.54	3.74	3.72	3.69±0.08
	微孔板法	3.55	3.61	3.49	3.58	3.48	3.69	3.57±0.07
3	试管法	4.25	4.40	4.37	4.34	4.28	4.41	4.34±0.06
	微孔板法	4.13	4.23	4.19	4.29	4.28	4.16	4.21±0.06
4	试管法	1.49	1.53	1.59	1.67	1.66	1.58	1.59±0.07
	微孔板法	1.52	1.48	1.42	1.43	1.55	1.50	1.48±0.05
5	试管法	1.78	1.88	1.75	1.68	1.59	1.93	1.77±0.12
	微孔板法	1.66	1.74	1.67	1.58	1.53	1.68	1.64±0.08
6	试管法	0.84	0.82	0.86	0.87	0.86	0.81	0.84±0.02
	微孔板法	0.68	0.77	0.74	0.69	0.70	0.72	0.72±0.03

参考文献

- Reig AJ, Conrad KS, Brunold TC. Combined spectroscopic/computational studies of vitamin B₁₂ precursors: Geometric and electronic structures of cobinamides [J]. *Inorg Chem*, 2012, 51(5): 2867–2879.
- 徐琼, 王志伟, 刘洋, 等. 维生素 B₁₂ 生物合成及检测技术研究进展[J]. *食品工业*, 2019, 40(6): 271–276.
Xu Q, Wang ZW, Liu Y, *et al.* Advances in biosynthesis and detection of vitamin B₁₂ [J]. *Food Ind*, 2019, 40(6): 271–276.
- 付炎, 李力更, 王于方, 等. 天然药物化学史话: 维生素 B₁₂ [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1259–1264.
Fu Y, Li LG, Wang YF, *et al.* Historical story on natural medicinal chemistry: vitamin B₁₂ [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2015, 46(9): 1259–1264.
- 谢璐遥, 王变, 马康, 等. 中国常见食物维生素 B₁₂ 含量[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(2): 73–76.
Xie LY, Wang B, Ma K, *et al.* The content of vitamin B₁₂ in Chinese common foods [J]. *Food Nutr Chin*, 2018, 24(2): 73–76.
- 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 J Food Hyg*, 2012, 24(4): 394–399.
- 赵静, 林清, 荣建琼, 等. 我国婴幼儿配方奶粉生产现状和发展趋势探讨[J]. *中国牛业科学*, 2016, 42(5): 64–66.
Zhao J, Lin Q, Rong JQ, *et al.* Discussion of the production status and development trends of infant formula in China [J]. *Chin Cattle Sci*, 2016, 42(5): 64–66.
- 王娟, 蒋琦. 叶酸及维生素 B₁₂ 强化促进红细胞生成素防治早产儿贫血疗效观察[J]. *中国儿童保健杂志*, 2011, 19(4): 366–367.
Wang J, Jiang Q. Observation of treatment of anaemia in preterm infants with folic acid and vitamin B₁₂ promote erythropoietin [J]. *Chin J Child Health Care*, 2011, 19(4): 366–367.
- 吴桐菲, 丁圆, 李溪远, 等. 母亲维生素 B₁₂ 缺乏与婴儿继发性甲基丙二酸血症[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2017, 13(4): 39–45.

- Wu TF, Ding Y, Li XY, *et al.* Maternal vitamin B₁₂ deficiency and infants with secondary methylmalonic aciduria [J]. *Chin J Obstetrics Gynecol Pediatr (Electron Ed)*, 2017, 13(4): 39–45.
- [9] Karmi O, Zayed A, Baraghehi S. Measurement of vitamin B₁₂ concentration: A review on available method [J]. *IIOAB J*, 2011, 2(2): 23–32.
- [10] 崔明, 杨大进, 鲁杰, 等. 维生素 B₁₂ 检测技术研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2011, (37): 166–171.
- Cui M, Yang DJ, Lu J, *et al.* Research progress on detection technology of vitamin B₁₂ [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, (37): 166–171.
- [11] Kumar SS, Chouhan RS, Thakur MS. Trends in analysis of vitamin B₁₂ [J]. *Anal Biochem*, 2009, 398(2): 139–149.
- [12] 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 Standard-The determination of vitamin B₁₂ in infant food and milk products [S].
- [13] The United States Pharmacopoeia Committee United States Pharmacopoeia [Z].
- [14] AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists [Z].
- [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): 49–53.
- Lu SJ, Tian Y. Discussion on determination of vitamin B₁₂ in foods for infants and young children, milk and milk products [J]. *Chin Dairy Ind*, 2013, 41(2): 49–53.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



王 晶, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: wangjing@caiqtest.com