

# 微孔板法检测婴幼儿配方乳粉中 维生素 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub>, 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 B<sub>12</sub> 的含量。

**关键词:** 维生素 B<sub>12</sub>; 微孔板; 配方乳粉

## Detection of vitamin B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub>, 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 B<sub>12</sub> content in infant formula milk powder.

**KEY WORDS:** vitamin B<sub>12</sub>; 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 B<sub>12</sub> 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<sup>[1]</sup>。维生素 B<sub>12</sub> 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)<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。人体自身不能合成维生素 B<sub>12</sub>, 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 B<sub>12</sub><sup>[4]</sup>。目前应用在医药、食品和饲料中的维生素 B<sub>12</sub> 多为氰基钴胺素<sup>[5]</sup>, 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<sup>[6]</sup>。

维生素 B<sub>12</sub> 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<sup>[7]</sup>。对于婴幼儿来讲, 维生素 B<sub>12</sub> 会影响其身体发育, 若摄入不足, 会导致维生素 B<sub>12</sub> 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<sup>[8]</sup>。

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 B<sub>12</sub> 是乳粉标签的必检项目。维生素 B<sub>12</sub> 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<sup>[9-11]</sup>。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<sup>[12]</sup>, 美国药典(United States Pharmacopeia, USP)<sup>[13]</sup>和美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)<sup>[14]</sup>都将微生物法作为维生素 B<sub>12</sub> 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<sup>[15]</sup>应用德国拜发公司的 VitaFast vitam in B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 测定培养基(美国 BD 公司); 维生素 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 标准储备液(100 μg/mL): 精确称取维生素 B<sub>12</sub> 标准品 10.2 mg, 用 25%乙醇溶液溶解, 定容至 100 mL。

维生素 B<sub>12</sub> 标准中间液(100 ng/mL): 吸取 100 μL 维生素 B<sub>12</sub> 标准储备液, 用 25%乙醇溶液稀释, 定容至 100 mL。

维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液(0.10 ng/mL, 0.05 ng/mL): 吸取 100 μL 维生素 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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<sup>[12]</sup>方法提取样品, 根据样品中维生素 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 标准品工作液的配制  
Table 1 The preparation of vitamin B<sub>12</sub> 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/ $\mu\text{L}$	150	150	120	90	60	30	0	60	30	0
标准溶液/ $\mu\text{L}$	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/ $\mu\text{L}$	0	75	112.6	131.2
样品测定液/ $\mu\text{L}$	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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 浓度在 0.00 ~ 0.10 ng/mL, 标准曲线的线性关系良好,  $r^2=0.9987$ 。

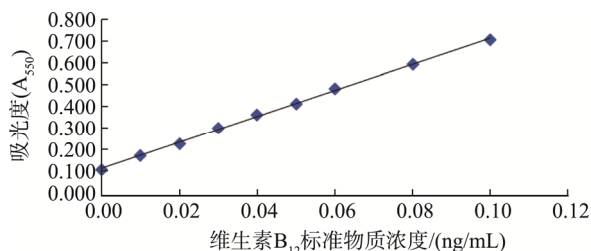


图 1 维生素 B<sub>12</sub> 标准曲线

Fig.1 The standard curve of vitamin B<sub>12</sub>

#### 3.2 加标回收实验

用未添加维生素 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 <sub>12</sub> 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 <sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> [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 B<sub>12</sub> [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1259–1264.  
Fu Y, Li LG, Wang YF, *et al.* Historical story on natural medicinal chemistry: vitamin B<sub>12</sub> [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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> in Chinese common foods [J]. *Food Nutr Chin*, 2018, 24(2): 73–76.
- 吕颖坚, 黄俊明. 维生素 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> [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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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, Baragethi S. Measurement of vitamin B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, (37): 166–171.
- [11] Kumar SS, Chouhan RS, Thakur MS. Trends in analysis of vitamin B<sub>12</sub> [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 B<sub>12</sub> 的测定[S].
- GB 5413. 14–2010 National Food Safety Standard-The determination of vitamin B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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