

2 种微孔板试剂盒测定奶粉中 3 种水溶性维生素的对比研究

涂晓波^{1,2}, 王舒乐³, 黄欣迪^{1,2}, 齐延林³, 赵芳^{1,2}, 万志刚^{1,2},
马淑棉^{1,2}, 张恒^{3,1}, 吕敬章^{1,2*}

(1. 深圳海关食品检验检疫技术中心, 深圳 518045; 2. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳 518045;
3. 深圳市瑞赛生物技术有限公司, 深圳 518101)

摘要: **目的** 采用微板试剂盒 A 和进口微板试剂盒 B 测定奶粉中生物素、叶酸和维生素 B₁₂ 3 种水溶性维生素的含量, 并进行对比研究。**方法** 通过绘制标准曲线、准确性实验、重复性实验及加标回收实验对 2 个品牌维生素检测试剂盒进行评价。**结果** 2 个品牌试剂盒的相关系数均在 0.99 以上。试剂盒 A 和试剂盒 B 的生物素、叶酸及维生素 B₁₂ 的样品检测结果间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.08%~7.25%、0.43%~9.25% 和 0.70%~13.91%; 试剂盒 A 的精密度和回收率分别为 1.97%~9.26% 和 73.67%~110.48%; 试剂盒 B 的精密度和回收率分别为 1.17%~5.40% 和 72.67%~120.00%。**结论** 2 种试剂盒的性能均满足检测要求, 试剂盒 A 操作较简便, 可替代进口微孔板试剂盒, 用于奶粉中生物素、叶酸、维生素 B₁₂ 3 种水溶性维生素的测定。

关键词: 微孔板试剂盒; 水溶性维生素; 比对研究

Comparative study of 2 kinds microplate kits for the determination of 3 kinds of water-soluble vitamins in milk powder

TU Xiao-Bo^{1,2}, WANG Shu-Le³, HUANG Xin-Di^{1,2}, QI Yan-Lin³, ZHAO Fang^{1,2}, WAN Zhi-Gang^{1,2},
MA Shu-Mian^{1,2}, ZHANG Heng^{3*}, LV Jing-Zhang^{1,2*}

(1. Food Inspection and Quarantine Technology Center of Shenzhen Customs District, Shenzhen 518045, China;
2. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518045, China;
3. Shenzhen Real Assay Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518101, China)

ABSTRACT: Objective To determine the 3 water-soluble vitamins, namely, biotin, folic acid and vitamin B₁₂ in milk powder by a microplate kit A and an imported microplate kit B, and conducte a comparative study. **Methods** The 2 brands of vitamin test kits were evaluated by plotting standard curves, accuracy tests, repeatability tests, and spiked recovery tests. **Results** The correlation coefficient for both kits was above 0.99. The relative standard

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFC1605402)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Plan(2019YFC1605402)

*通讯作者: 张恒, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: info@realassay.com

吕敬章, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: ficssw@126.com

*Corresponding author: ZHANG Heng, Ph.D, Senior Engineer, Shenzhen Real Assay Technology Co., Ltd, Hatching Building 313, Baoan Taohuayuan Science and Technology Innovation Park, Shenzhen 518101, China. E-mail: info@realassay.com

LV Jing-Zhang, Master, Chief Technician, Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, No.1011 Fuqiang Road, Shenzhen 518045, China. E-mail: ficssw@126.com

deviation for biotin, folic acid and vitamin B₁₂ were 0.08%–7.25%, 0.43%–9.25% and 0.70%–13.91% for kit A and kit B, respectively. The RSDs and recovery rates of kit A were 1.97%–9.26% and 73.67%–110.48%, respectively; those of kit B were 1.17%–5.40% and 72.67%–120.00%, respectively. **Conclusion** The performance of the 2 kits can meet the requirements of the test, and reagent kit A is more convenient and can replace the imported microplate kit for the determination of biotin, folic acid and vitamin B₁₂ in water-soluble vitamins in milk powder.

KEY WORDS: microplate kit; water-soluble vitamin; comparative study

1 引言

微量营养素缺乏或摄入过量均会对人体造成伤害^[1,2], 因此在进行补充和强化微量营养素时, 需限定在合适的范围内。另外, 必须对营养素补充剂和强化剂进行定量测定以对产品进行质量控制, 保证人体摄入在合理的水平^[3]。

传统微生物法是作为测定食品中生物素、叶酸、维生素 B₁₂ 食品安全标准的首选方法^[4,5]。微生物法利用维生素是微生物生长的必要条件, 将检测体系中的微生物总量或新陈代谢产物的总量判定为被测物中维生素的含量^[6-9]。对于维生素含量较低、基质较复杂的样品, 微生物法具有较高的灵敏度及精确度^[10,11], 但国标检测方法易受实验接种菌量、菌活力、标准溶液、培养基成分、样品处理方法以及人员操作等多种因素影响, 使得传统微生物法检测结果存在 20% 不确定度^[12]。菌种保存及传代过程易受污染或发生突变, 样品前处理需进行多次 pH 调值及稀释, 分光光度计连续 8 h 仅能检测 20 个样品^[13], 方法建立难度相对较高, 容错率低^[14], 检测周期较长且重复性差, 不能满足大批量快速检测^[15]。

微孔板式微生物法试剂盒对维生素国标检测方法中的主要检测体系进行了加工生产与优化, 充分遵循检测原理, 利用先进加工技术保证各孔细菌活力、维生素标准溶液及培养基成分的稳定性^[16], 建立一孔一体系一检测的微量快速检测方法。而酶标联免疫测定仪的引入, 使得读取数据及检测结果获得效率大大提高, 降低孵育时间不一致导致检测结果偏差的影响^[17]。目前市场上不同品牌的维生素检测试剂盒质量参差不齐, 进口和国产试剂盒的准确性、精密度和灵敏度等都存在较大差异。

本研究采用自主研发和进口的维生素系列检测试剂盒, 对奶粉中的生物素、叶酸和维生素 B₁₂ 进行检测, 按照 SN/T 2775-2011《商品化食品检测试剂盒评价方法》^[18]对标准曲线线性范围、定量限、准确性、精密度和回收率等评价指标进行比较, 为进口检测试剂盒的替代提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

AL204 精密电子天平(上海 Mettler Toledo 有限公司); MNE 水浴箱(德国 Memmert 有限公司); CR22GII 冷冻离心

机(日本 HITACHI 公司); SG-403A 生物安全柜(美国 Baker 公司); Vortex Maxi Mix II 涡旋振荡器(美国 Thermo 有限公司); BD115 恒温培养箱(德国 Binder 公司); EPOCH2T 酶标仪(美国 BioTek 有限公司); 移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

生物素标准品(>98%)、叶酸标准品(>98.5%)、维生素 B₁₂ 标准品(>99.2%)(美国 Supelco 公司)。

试剂盒 A: Realassay[®] 生物素检测试剂盒(RSB.140928)、Realassay[®] 叶酸检测试剂盒(RSF.140928)、Realassay[®] 维生素 B₁₂ 检测试剂盒(RS12.140928)(深圳市瑞赛生物技术有限公司)。

试剂盒 B: VitaFast[®] 生物素检测试剂盒(KB 43900)、VitaFast[®] 叶酸检测试剂盒(KF 43760)、VitaFast[®] 维生素 B₁₂ 检测试剂盒(K12 43885)(德国拜发公司)。

样品: 1 个标准质控奶粉(NO: 4044755861)及 7 个市售的婴幼儿配方奶粉, 该标准质控奶粉样品的生物素含量范围为(26.55±4.25) μg/100 g, 叶酸含量范围为(110.84±15.68) μg/100 g, 维生素 B₁₂ 含量范围为(2.5±0.38) μg/100 g。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理方法

称量 1 g(mL)均质样品至 1 个 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 样品提取液, 摇匀。在 95 °C 水浴中提取 30 min 后, 期间振荡至少 5 次, 迅速冷却至 30 °C 以下, 然后 8000 r/min 离心 5 min, 根据样品标识浓度, 计算样品稀释倍数, 并在 1.5 mL 无菌试管中进一步稀释样品上清液。

试剂盒 A 样品提取溶液, 处理 1 份样品可完成生物素、叶酸及维生素 B₁₂ 3 项检测项目^[19]。20 倍的样品浓缩提取液使用前需加热充分溶解(加热温度 ≤60 °C), 溶解完全后再稀释 20 倍备用。

试剂盒 B 样品提取溶液, 按说明书分别配制生物素、叶酸和维生素 B₁₂ 的样品提取溶液。

2.2.2 测试培养基的制备

取出测试培养基瓶子中的干燥剂, 加入所需体积的无菌水至培养基瓶中, 盖好摇匀后, 水浴加热该瓶至 95~99 °C 保持 5 min, 期间至少振荡 2 次, 加热完成后迅速冷却至室温(30 °C 以下), 使用 0.22 μm 无菌滤膜过滤培养基至无菌离心管中备用。其中, 试剂盒 A 的维生素 B₁₂ 测试培养基在加热冷却后需添加维生素 B₁₂ 缓冲液; 试剂盒

B 的叶酸测试培养基在加热冷却前需添加叶酸缓冲液。

2.2.3 标准曲线的绘制

按照检测试剂盒说明书, 使用试剂盒内无菌水稀释标准品。(1)试剂盒 A 标准品: 移取所需体积无菌水至前 7 个标准品微孔中, 并用移液枪吹打均匀备用。(2)试剂盒 B 标准品: 移取所需体积无菌水至瓶装标准品内, 混匀后获得标准品浓缩液, 再按照标准曲线系列浓度, 于无菌试管中进一步稀释配制成 5 个浓度标准品溶液备用。以标准品浓度($\mu\text{g}/100\text{g}$)为横坐标, 以对应吸光度(620 nm)为纵坐标, 绘制生物素、叶酸、维生素 B₁₂ 的标准曲线。标准曲线的系列浓度见表 1。

表 1 标准曲线系列浓度($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Table 1 Concentration of standard curve($\mu\text{g}/100\text{g}$)

| 品牌 | 项目 | 浓度 1 | 浓度 2 | 浓度 3 | 浓度 4 | 浓度 5 | 浓度 6 |
|----|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| A | 生物素 | 0.04 | 0.16 | 0.32 | 0.64 | 1.12 | 1.6 |
| | 叶酸 | 0.1 | 0.4 | 0.8 | 1.2 | 1.8 | 3.4 |
| | 维生素 B ₁₂ | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.18 | 0.36 |
| B | 生物素 | 0.08 | 0.24 | 0.4 | 0.56 | 0.72 | - |
| | 叶酸 | 0.16 | 0.32 | 0.64 | 0.96 | 1.28 | - |
| | 维生素 B ₁₂ | 0.032 | 0.064 | 0.090 | 0.120 | 0.180 | - |

2.2.4 培养、读数与结果计算

取出需要数量的微孔板条固定在板架上, 移取 150 μL 测试培养基至微板孔中, 再移取 150 μL 标准品或稀释好的样品至指定的微板孔中。加液完成后, 使用封口膜充分封闭微孔板条, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境孵育。试剂盒 A 的培养时间为 20~24 h, 试剂盒 B 的培养时间为 44~48 h。培养完成后, 将微孔板置于桌面上并充分水平振荡, 使培养体系溶解均一后, 撕去封口膜并使用移液枪头破坏微孔中液体表面的所有泡沫, 用酶标仪于 620 nm 波长读取吸光度, 绘制浓度-吸光度标准曲线并计算样品含量结果, 样品前处理稀释 40 倍已包含在标准曲线中, 以下公式中, 只需要考虑提取样品上清液的进一步稀释倍数及样品重量。样品中维生素含量的计算公式如(1)所示:

$$\text{维生素含量}(\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{\text{检测结果浓度} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品重量}(\text{g})} \quad (1)$$

2.2.5 试剂盒评价实验方法

(1)准确性实验

分别使用 2 个品牌试剂盒, 对已知含量的质控奶粉及其中 4 个市售的婴幼儿配方奶粉进行 6 平行测定, 并计算 2 个品牌试剂盒检测结果间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 比较试剂盒对质控奶粉检测的准

确性及市售婴幼儿奶粉样品检测结果的偏倚。相对标准偏差计算公式如(2)所示:

$$\text{相对标准偏差 RSD}(\%) = \frac{\text{标准偏差}}{\text{平均值}} \times 100\% \quad (2)$$

(2)重复性实验

精密度旨在表示实验方法检测结果之间的一致程度^[20], 通常用相对标准偏差来分析, RSD 值越小, 实验方法越稳定、重现性越好^[21]。分别使用 2 种维生素检测试剂盒, 对其中 3 个市售的婴幼儿配方奶粉进行 6 平行测定, 计算检测结果平均值和相对标准偏差。

(3)加标回收实验

加标回收实验是分析化学组分结果中常用的实验方法和重要的质控手段, 回收率是判定分析结果准确度的量化指标^[22]。参考 GB 5009.259-2016《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》^[23]、GB 5009.211-2014《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》^[24]和 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》^[25] 配制 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生物素标准中间液、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的叶酸标准储备液、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维生素 B₁₂ 标准中间液。称取 4 份 1.000 g 的标准质控奶粉样品, 并对其中 3 份标准质控奶粉样品进行 3 水平加标, 分别加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素标准溶液 200、400、600 μL , 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 叶酸标准溶液 45、90、135 μL , 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 B₁₂ 标准溶液 300、600、900 μL 。分别使用 2 种试剂盒对 3 个检测项目不同加标含量的样品进行 6 次平行测定, 并计算不同加标量检测结果的平均值和回收率, 回收率计算公式如(3)所示:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{加标样品测定值} - \text{样品本底测定值}}{\text{加标量}} \times 100\% \quad (3)$$

3 结果与分析

3.1 标准曲线

标准曲线如图 1 所示。A 品牌和 B 品牌生物素检测试剂盒的标准曲线线性范围分别为 0.04~1.6 和 0.08~0.72 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (A 和 B), 定量限分别为 0.04 和 0.08 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 相关系数 r^2 分别为 0.9983 和 0.9991。A 品牌和 B 品牌叶酸检测试剂盒的标准曲线线性范围分别为 0.1~3.4 和 0.16~1.28 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (C 和 D), 定量限分别为 0.1 和 0.16 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 相关系数 r^2 分别为 0.9983 和 0.9997。A 品牌和 B 品牌维生素 B₁₂ 检测试剂盒的标准曲线线性范围分别为 0.015~0.36 和 0.032~0.18 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (E 和 F), 定量限分别为 0.015 和 0.032 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 相关系数 r^2 均为 0.9995。A 品牌和 B 品牌检测试剂盒标准曲线 r^2 均大于 0.99, 线性关系良好, A 品牌标准曲线线性范围相对更宽, 定量限更低, 利于不同浓度含量的样品使用较集中的稀释倍数, 减少差异化稀释度的操作困难^[26]。

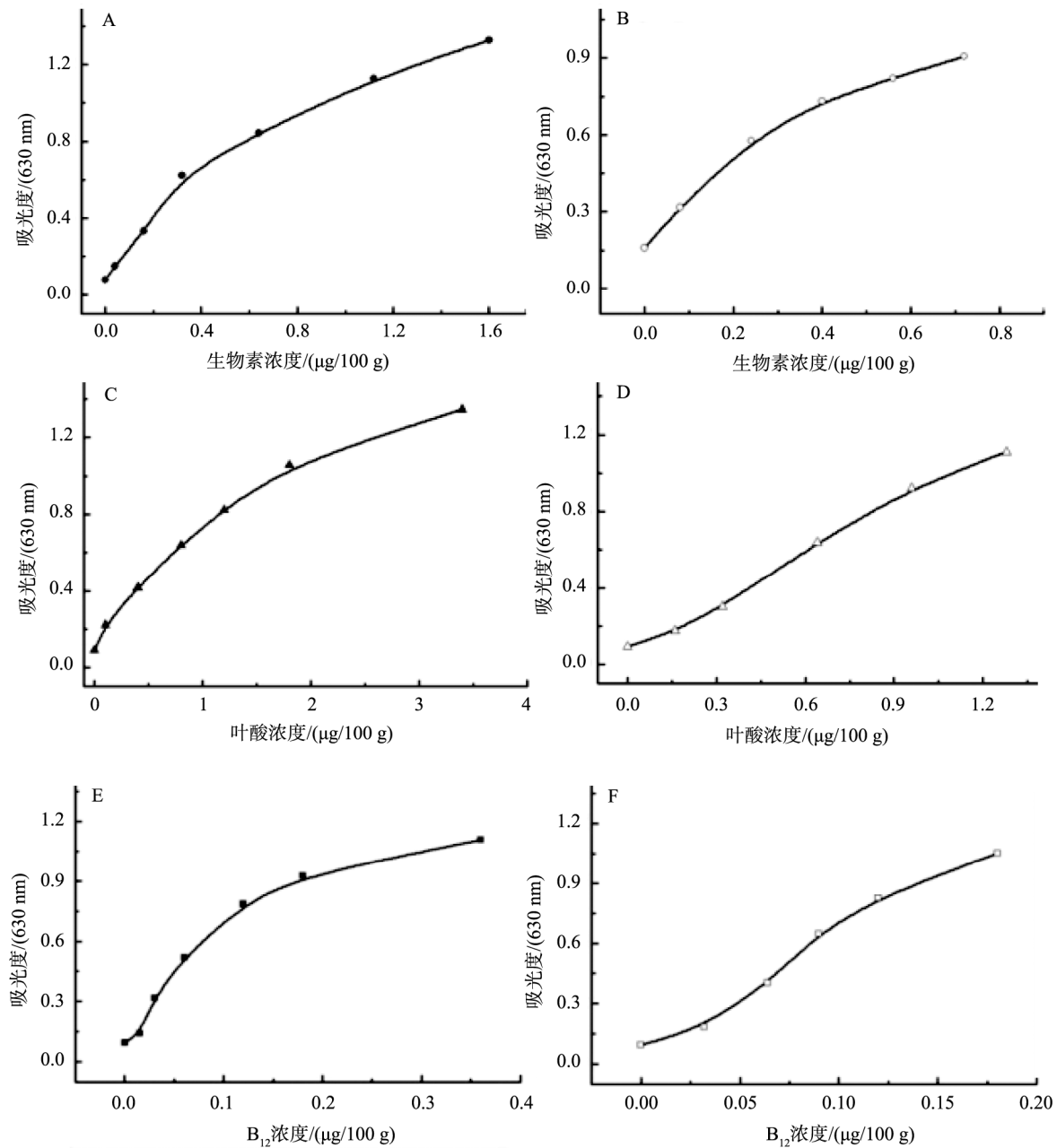
3.2 准确性实验结果

按 2.2.5(1)所述方法实验, 结果见表 2。A 品牌和 B 品牌对质控奶粉样品的维生素 B₁₂ 含量检测结果间 RSD 大于 10%, 但结果均在质控范围内, 满足维生素项目的检测要求。其余检测结果间的 RSD 均小于 10%, 可见 A 品牌和 B 品牌对奶粉中的生物素、叶酸和维生素 B₁₂ 检测结果较一

致, 对质控奶粉检测结果准确性较高。

3.3 重复性实验结果

按 2.2.5(2)所述方法实验, 结果见表 3。A 品牌和 B 品牌的维生素检测试剂盒 RSD 均小于 10%, 表明 6 个检测试剂盒均具有较好的精密度, 实验方法稳定, 检测结果重现性好, B 品牌的精密度较 A 品牌更高。



注: A: A 品牌生物素标准曲线; B: B 品牌生物素标准曲线; C: A 品牌叶酸标准曲线; D: B 品牌叶酸标准曲线; E: A 品牌维生素 B₁₂ 标准曲线; F: B 品牌维生素 B₁₂ 标准曲线。

图 1 标准曲线

Fig.1 Standard curve

3.4 加标回收实验结果

按 2.2.5(3)所述方法实验, 结果见表 4。结果表明, A 品牌维生素检测试剂盒有更佳的平均回收率且具有更小的离散变化, 可见 A 品牌试剂盒‘三合一’的样品前处理方法可有效去除基质且不会造成待测组分的损失, 该方法检测婴幼儿配方奶粉中生物素、叶酸、维生素 B₁₂ 含量的结果可靠性大。而维生素 B₁₂ 检测项目, 2 个品牌试剂盒均出现较低的样品加标回收率。再次进行维生素 B₁₂ 空白加标回收实验, A 品牌和 B 品牌的维生素 B₁₂ 试剂盒空白加标回收率分别为 96.67%~98.33%和 58.33%, 可能因样品基质效应或菌种特异性差异等因素带来样品加标回收率的偏差。

4 结论与讨论

相比国标微生物法, 微孔板式微生物法操作简便, 交叉污染少, 能避免国标法中因菌种活力、试剂稳定性等影响造成的一系列误差。但需要注意的是, 检测试剂盒配套标准溶液的保藏与配制是影响实验结果准确性的关键因素^[15]。

本研究分别使用 A 品牌和 B 品牌的维生素检测试剂盒, 定量检测婴幼儿配方奶粉中生物素、叶酸、维生

素 B₁₂ 的含量。6 个试剂盒的标准曲线相关系数均在 0.99 以上。A 品牌维生素试剂盒具有更宽的标准曲线跨度和更低的检出限, 可减少样品差异化的稀释度, 满足较宽浓度范围的样品检测。2 个品牌的维生素检测试剂盒相对标准偏差均小于 10%, B 品牌试剂盒精密度相对 A 品牌更高, 2 个品牌试剂盒检测体系稳定性较高, 检测结果重复性好。

2 个品牌的试剂盒检测结果均满足检测要求^[27], 但在操作方面, A 品牌试剂盒操作更简易、更高效。与 B 品牌样品前处理方法相比, A 品牌试剂盒配套的“三合一”样品提取液统一了生物素、叶酸和维生素 B₁₂ 样品前处理方法, 处理 1 份样品可完成 3 种水溶性维生素项目的检测, 且结合实验过程的观察, 该提取液有效去除奶粉中的蛋白质及脂肪, 使得样品提取上清液更清澈, 有利于提高低含量低稀释倍数样品检测的准确性。在标准品配制方面, A 品牌试剂盒标准品的配制只需加无菌水入板条式标准品孔中混匀即可使用, 省去 B 品牌瓶装标准品由浓缩标准溶液再梯度稀释的配制工作, 降低实验人员的操作难度。培养时间上, B 品牌试剂盒需培养 44~48 h, A 品牌仅需 20~24 h 的培养时间, 进一步提高了微孔板式微生物法的检测效率。

表 2 准确性实验结果
Table 2 Results of accuracy experiment

| 项目 | 样品 | 标识/($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | A 品牌/($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | B 品牌/($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | RSD/% |
|---------------------|----|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------|
| 生物素 | 质控 | 26.55±4.25 | 29.04 | 26.28 | 7.06 |
| | 1 | 199 | 230.4 | 215.1 | 4.86 |
| | 2 | 9 | 43.45 | 46.55 | 4.87 |
| | 3 | 24 | 34.8 | 38.56 | 7.25 |
| | 4 | 11 | 27.4 | 27.37 | 0.08 |
| 叶酸 | 质控 | 110.84±15.68 | 108.50 | 111.00 | 1.61 |
| | 1 | 75.20 | 111.40 | 127.00 | 9.25 |
| | 2 | 93.10 | 122.75 | 122.00 | 0.43 |
| | 3 | 75.8 | 113.4 | 128 | 8.55 |
| | 4 | 95.00 | 114.50 | 127.00 | 7.32 |
| 维生素 B ₁₂ | 质控 | 2.5±0.38 | 2.68 | 2.2 | 13.91 |
| | 1 | 4 | 4.04 | 4 | 0.70 |
| | 2 | 1.05 | 4.08 | 3.72 | 6.53 |
| | 3 | 2.2 | 3.64 | 3.56 | 1.57 |
| | 4 | 1.59 | 2.03 | 2.01 | 0.70 |

表 3 重复性实验结果($n=6$)
Table 3 Results of repeated experiment ($n=6$)

| 项目 | 品牌 | 样品 | 检测结果/($\mu\text{g}/100\text{g}$) | | | | | | 平均值/($\mu\text{g}/100\text{g}$) | RSD/% |
|---------------------|----|----|------------------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|-----------------------------------|-------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| 生物素 | A | 1 | 53.80 | 52.00 | 52.00 | 51.20 | 53.40 | 53.40 | 52.63 | 1.97 |
| | | 2 | 75.90 | 77.40 | 75.60 | 74.10 | 75.90 | 78.60 | 76.25 | 2.04 |
| | | 3 | 77.60 | 99.60 | 97.20 | 92.40 | 96.40 | 98.40 | 93.60 | 8.77 |
| | B | 1 | 48.60 | 49.40 | 48.00 | 49.40 | 49.40 | 49.00 | 48.97 | 1.17 |
| | | 2 | 73.20 | 71.40 | 71.70 | 72.60 | 73.20 | 71.40 | 72.25 | 1.19 |
| | | 3 | 102.40 | 105.20 | 102.80 | 99.60 | 99.20 | 96.80 | 101.00 | 2.99 |
| 叶酸 | A | 1 | 269.4 | 303.6 | 298.8 | 314.4 | 292.8 | 306.6 | 297.60 | 5.25 |
| | | 2 | 645.6 | 755.2 | 778.4 | 771.2 | 743.2 | 776 | 744.93 | 6.78 |
| | | 3 | 1221 | 1273 | 1279 | 1239 | 1200 | 1268 | 1246.67 | 2.56 |
| | B | 1 | 292 | 325 | 296 | 300 | 322 | 296 | 305.17 | 4.74 |
| | | 2 | 579 | 561 | 610 | 565.5 | 642 | 616.5 | 595.67 | 5.40 |
| | | 3 | 1048 | 1036 | 1088 | 1094 | 1036 | 1084 | 1064.33 | 2.56 |
| 维生素 B ₁₂ | A | 1 | 4.68 | 4.77 | 4.77 | 4.32 | 4.41 | 4.68 | 4.61 | 4.18 |
| | | 2 | 6.44 | 6.30 | 7.00 | 7.00 | 7.28 | 7.42 | 6.91 | 6.49 |
| | | 3 | 8.36 | 8.74 | 8.74 | 9.69 | 10.45 | 8.36 | 9.06 | 9.26 |
| | B | 1 | 4.41 | 4.68 | 4.77 | 4.59 | 4.77 | 4.5 | 4.62 | 3.18 |
| | | 2 | 6.30 | 6.58 | 6.72 | 6.44 | 6.58 | 6.72 | 6.56 | 2.50 |
| | | 3 | 8.36 | 8.74 | 8.74 | 8.93 | 9.31 | 8.93 | 8.84 | 3.53 |

表 4 加标回收实验结果
Table 4 Results of recovery experiment

| 项目 | 加标量/($\mu\text{g}/100\text{g}$) | A 品牌 | | B 品牌 | |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | | 测定值/($\mu\text{g}/100\text{g}$) | 回收率/% | 测定值/($\mu\text{g}/100\text{g}$) | 回收率/% |
| 生物素 | 20 | 20.59 | 102.95 | 20.2 | 101.00 |
| | 40 | 44.19 | 110.48 | 43.5 | 108.75 |
| | 60 | 61.59 | 102.65 | 72 | 120.00 |
| 叶酸 | 90 | 82.9 | 92.1 | 91.2 | 101.3 |
| | 180 | 196.8 | 109.3 | 189.9 | 105.5 |
| | 270 | 254.7 | 94.3 | 261.9 | 97.0 |
| 维生素 B ₁₂ | 3 | 2.27 | 75.67 | 2.66 | 88.67 |
| | 6 | 4.6 | 76.67 | 4.66 | 77.67 |
| | 9 | 6.63 | 73.67 | 6.54 | 72.67 |

参考文献

- Geisel J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy: A review [J]. J Perinat Neonat Nurs, 2003, 17(4): 268–279.
- Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency [J]. Expert Rev Endocrinol Metab, 2008, 3(6): 715–724.
- 李晓瑜. 微量营养素风险评估在食品强化标准制修订中的应用研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010.
Li XY. Application of micronutrient risk assessment in the formulation and revision of food fortification standards [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2010.
- Kapil B, Mahesh K, Vipin S, et al. Microbiological assay for vitamin B [J]. Int Res J Pharm, 2012, 3(2): 74–82.
- 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. Discussion on determination of vitamin B₁₂ in foods for infants and young children, milk and milk products [J]. China Dairy Ind, 2013, 41(2): 50–55.
- 毛伟贞. 维生素的国际标准检测方法研究[J]. 中国高新技术企业, 2012, (14): 34–35.

- Mao WZ. Study on international standard detection method of vitamins [J]. Chin High-Tech Enterp, 2012, (14): 34–35.
- [7] Karmi O, Zayed A, Baragheithi S, *et al.* Measurement of vitamin B₁₂ concentration: A review on available methods [J]. Iioab J, 2011, 2(2): 23–32.
- [8] Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B₁₂ performed in 96-well microtitre plates [J]. J Clin Pathol, 1991, 44(7): 592–595.
- [9] Koontz JL, Phillips KM, Wunderlich KM, *et al.* Comparison of total folate concentrations in foods determined by microbiological assay at several experienced U.S. commercial laboratories [J]. J AOAC Int, 2005, 88(3): 805–813.
- [10] Gregory ME. The microbiological assay of vitamin B₁₂ in the milk of different animal species [J]. Brit J Nutr, 1954, (8): 340–347.
- [11] 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 Dairy Ind, 2008, 36(10): 58–60.
- [12] Blake CJ. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: A review [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(1): 63–76.
- [13] 李娜, 王一村, 王萌, 等. 奶粉中维生素 B₁₂ 及叶酸的检测方法对比[J]. 中国标准化, 2018, (5): 120–126.
Li N, Wang YC, Wang M, *et al.* Comparison of detection methods for vitamin B₁₂ and folic acid in milk powder [J]. China Stand, 2018, (5): 120–126.
- [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, (13): 338–344.
Li QX, Cui YJ, Zhao YF, *et al.* Principle and progress of microbial determination of water soluble vitamins in food [J]. Food Sci, 2013, (13): 338–344.
- [15] 王赢, 袁辰刚, 谢小珏, 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): 269–272.
Wang Y, Yuan CG, Xie XJ, *et al.* Study on rapid determination of vitamin B₁₂ in infant milk powder by microporous plate method [J]. Food Ind, 2015, 36(6): 269–272.
- [16] 姚春华, 洪敏, 胡克岐. 微孔板式微生物法快速检测奶粉中维生素 B₁₂ 含量[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(12): 2096–2098.
Yao CH, Hong M, Hu KQ. Rapid determination of vitamin B₁₂ in milk powder by microplate microbial method [J]. Zhejiang Agric Sci, 2016, 57(12): 2096–2098.
- [17] 王旻. 试剂盒法测定奶粉中的维生素[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(3): 57–59.
Wang M. Determination of vitamin in milk powder by kit method [J]. China Dairy Ind, 2012, 40(3): 57–59.
- [18] SN/T 2775-2011 商品化食品检测试剂盒评价方法[S].
SN/T 2775-2011 Evaluation method of commercial detection kit for food [S].
- [19] Zhang H, Lan F, Shi YP, *et al.* A “three-in-one” sample preparation method for simultaneous determination of B-group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast®kits [J]. Food Chem, 2014, 153: 371–377.
- [20] GB/T 6379.1-2004 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 1 部分: 总则与定义[S].
GB/T 6379.1-2004 Accuracy (accuracy and precision) of measurement methods and results Part 1: General and definitions [S].
- [21] 许书道. 定量分析方法评价[J]. 化学分析计量, 2002, (1): 30–31.
Xu SD. Evaluation of quantitative analysis methods [J]. Chem Anal Meter, 2002, (1): 30–31.
- [22] 任成忠, 毛丽芬. 加标回收实验的实施及回收率计算的研究[J]. 工业安全与环保, 2006, (2): 9–11.
Ren CZ, Mao LF. Study on implementation and calculation of standard addition recovery experiment [J]. Ind Saf Environ Prot, 2006, (2): 9–11.
- [23] GB 5009.259-2016 食品安全国家标准 食品中生物素的测定[S].
GB 5009.259-2016 National food safety standard-Determination of biotin in food [S].
- [24] GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定[S].
GB 5009.211-2014 National food safety standard-Determination of folic acid in food [S].
- [25] 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-Determination of vitamin B₁₂ in infant food and dairy products [S].
- [26] 田浩, 王志伟, 顾文佳, 等. 微生物法测定食品中叶酸、泛酸、生物素、维生素 B₁₂ 注意事项和实践[J]. 中国标准化, 2018, (17): 127–130.
Tian H, Wang ZW, Gu WJ, *et al.* Precautions and practice of microbiological determination of folic acid, pantothenic acid, biotin and vitamin B₁₂ in food [J]. China Stand, 2018, (17): 127–130.
- [27] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Specification for laboratory quality control-Food physical and chemical testing [S].

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



涂晓波, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 654964533@qq.com



张恒, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: info@realassay.com



吕敬章, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: ficswsw@126.com