

# 《食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 预包被微孔板式微生物法》 编制说明

## 一、工作简况

### （一）任务来源、起草单位、起草人

#### 1. 背景

目前，对维生素 B<sub>12</sub> 含量进行检测的标准方法主要包括两类，分别是微生物法和以高效液相色谱法为代表的仪器分析方法。国内维生素 B<sub>12</sub> 含量的标准检测方法包括 2 个：《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》（GB 5413.14-2010）中规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法，采用微生物法，利用莱士曼氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii*（ATCC 7830）对维生素 B<sub>12</sub> 的特异性和灵敏性，定量测定出维生素 B<sub>12</sub> 的含量，检出限为 0.1 µg/100g。GB/T 5009.217-2008《保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定》规定了保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法，适用于片剂、胶囊、粉剂、功能性饮料类型保健食品中 B<sub>12</sub> 的测定，采用固相萃取法或免疫亲和色谱法对试样中的维生素 B<sub>12</sub> 进行富集并去除部分杂质后进行高效液相色谱分析。该方法使用固相萃取法处理样品时，取样量为 2.0 g，方法的检出限为 1.0 µg/g。当使用免疫亲和法处理样品时，片剂、胶囊、粉剂取样量为 2.0 g，方法的检出限为 0.05 µg/g；功能性饮料取样量为 20 mL，方法的检出限为 3.0 µg/L。为了评价食品标签上标注成分的准确性，美国联邦法规《食品营养标签》（21 CFR 101.9）规定优先采用 AOAC OM 检测方法进行含量测定。欧盟法规中未见对检测方法的明确规定，大部分检测实验室主要采用 AOAC 的检测方法。在食品行业广受认可的 AOAC 方法中，涉及维生素 B<sub>12</sub> 含量测定的官方方法主要有六个：AOAC OM 960.46《微生物法检测维生素通用性标准》、AOAC OM 952.20《微生物法测定维生素制剂中的维生素 B<sub>12</sub>》、AOAC OM 986.23《微生物比浊法测定乳基婴幼儿配方粉中的维生素 B<sub>12</sub>》、AOAC OM 2011.10《婴儿配方奶粉和成人营养品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 高效液相色谱法》、AOAC OM 2011.16《婴儿配方奶粉和成人营养品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 表面等离子共振法》和 AOAC OM 2014.02《婴儿配方奶粉和成人及儿童配方粉中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 超高压高效液相色谱法》。其中，AOAC OM 960.46、AOAC OM 952.20 和 AOAC OM 986.23 均采用微生物法进行维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定。AOAC OM 2011.10、AOAC OM 2011.16 和 AOAC OM 2014.02 分别采用配合维生素 B<sub>12</sub> 免疫亲和柱的高效液相色谱法、表面等离子共振法和配合维生素 B<sub>12</sub> 免疫亲和柱的超高压高效液相色谱法进行维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定。

采用微生物法，检测实验操作步骤复杂，每一次实验都需进行菌株的活化、转种、培养、测试菌液制备和培养基配制等人工操作步骤，对检测技术人员的专业技能要求较高，存在检测耗时长和重复性差等问题。采用液相色谱法等仪器分析方法，需要昂贵的检测仪器设备和耗材，对实验室硬件条件要求较高，检测结果容易受到成分复杂的样品中基质背景干扰的影响，且对于含量低于仪器检出限的样品仍然需要采用微生物法进行检测。与此同时，食品行业日常生产质控、食品安全监管部门开展食品安全监督检验、第三方检测机构为社会提供食品检验技术服务，均需要更加操作简便、经济高效、结果准确、适用性广的检测方法，现有标准方法尚不能完全满足。

在微生物法的基础上，为改善微生物培养过程中一系列影响检测技术性能的问题，国内外开展了大量基于微孔板式微生物法的检测技术研究，并开发出多种商业化的检测试剂产品。其中，德国 R-Biopharm AG 开发的 VitaFast®Vitamin B12 检测方法因突出的技术性能受到研究者的关注，并在国内外食品行业获得广泛应用。该检测方法通过了 AOAC 性能测试方法计划（AOAC® Performance Tested Methods<sup>SM</sup> Program）的评估（证书号：101002）。

VitaFast®Vitamin B12 检测方法同样采用 GB 5413.14-2010 中规定的菌株莱士曼氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii*（ATCC 7830），在预包被菌种的微孔中加入培养基和梯度浓度的维生素 B<sub>12</sub> 标准品/待测样品，可对婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、特殊医学用途配方食品、乳粉其调制产品、饮料类、粮食和粮食制品、片剂、胶囊、粉剂类型保健食品、糖果等多种食品进行定量检测，定性检测限为 0.021 µg/100g，定量检测限为 0.03 µg/100g。该检测方法对食品中维生素 B<sub>12</sub> 的微生物法检测进行了改进，以预包被菌种、检测试剂商品化和操作步骤简便化为特征。将莱士曼氏乳酸杆菌预包被至微孔中，省略了菌种保存和传代中存在的失活、变异和污染等问题。标准品和预配的干粉培养基仅需在使用前加入无菌水后简单处理即可使用，避免了大量检测试剂在实验室人工配制导致的检测结果重复性和再现性差等缺点，并且显著的提高了工作效率。在 2006 年 11 月 FAPAS® Proficiency Test 2143 能力验证“婴儿食品粉中的维生素（Vitamins in Powdered Baby Food）”中，有 2 家单位采用 VitaFast®Vitamin B12 开展维生素 B<sub>12</sub> 的定量检测，均获得“满意”评价，Z 值分别是 0.1 和-0.1。

## 2. 任务来源

任务来自《中国食品科学技术学会关于发布 2020 年团体标准立项计划的通知》（中食学字[2020]第 004 号）。项目编号 ttbz-2020-006。

## 3. 起草单位及起草人

起草单位：

起草人：

## （二）起草过程

项目组 2020 年 1 月申报中国食品科学技术学会团体标准项目。标准立项后，项目组通过在线会议等方式，完成了标准文本和编制说明，经过讨论并征求相关专家意见，形成目前征求意见稿。

## 二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

目前，我国涉及食品中 B<sub>12</sub> 检测方法标准包括 GB 5413.14-2010 和 GB/T 5009.217-2008。

《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》中规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法，采用微生物法，利用莱士曼氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 对维生素 B<sub>12</sub> 的特异性和灵敏性，定量测定出维生素 B<sub>12</sub> 的含量。GB/T 5009.217-2008 规定了保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法，适用于片剂、胶囊、粉剂、功能性饮料类型保健食品中 B<sub>12</sub> 的测定，采用固相萃取法或免疫亲和色谱法对试样中的维生素 B<sub>12</sub> 进行富集并去除部分杂质，高效液相色谱分析。GB 5413.14-2010，仅适用于婴幼儿食品和乳品。GB/T 5009.217-2008 适用于保健食品，采用液相色谱法。

本标准采用 VitaFast®Vitamin B12 检测方法，适用于婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、特殊医学用途配方食品、乳粉及其调制产品、饮料类（包括固体饮料）、粮食和粮食制品、片剂、胶囊、粉剂类型保健食品、糖果。对这些食品中维生素 B<sub>12</sub> 含量进行测定，使用与 GB 5413.14-2010 一致的菌株——莱士曼氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830)，以预包被菌种、检测试剂商品化和操作步骤简便化为特征，对微生物法进行了改进。将莱士曼氏乳酸杆菌预包被至微孔中，省略了菌种保存和传代中存在的失活、变异和污染等问题。标准品和预配的干粉培养基仅需在使用前加入无菌水后简单处理即可使用，避免了大量检测试剂在实验室人工配制导致的检测结果重复性和再现性差等缺点，并且显著的提高了工作效率。

## 三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

为了评价食品标签上标注成分的准确性，美国联邦法规《食品营养标签》(21 CFR 101.9) 规定优先采用 AOAC OM 检测方法进行含量测定。欧盟法规中未见对检测方法的明确规定，大部分检测实验室主要采用 AOAC 的检测方法。在食品行业广受认可的 AOAC 方法中，涉及维生素 B<sub>12</sub> 含量测定的官方方法主要有 6 个：AOAC OM 960.46《微生物法检测维生素通用性标准》、AOAC OM 952.20《微生物法测定维生素制剂中的维生素 B<sub>12</sub>》、AOAC OM 986.23《微生物比浊法测定乳基婴幼儿配方粉中的维生素 B<sub>12</sub>》、AOAC OM 2011.10《婴儿配方奶粉和成人营养品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 高效液相色谱法》、AOAC OM 2011.16《婴儿配方奶粉和成人营养品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 表面等离子共振法》和 AOAC OM 2014.02《婴儿配方奶粉和成人及儿童配方粉中维生素 B<sub>12</sub> 的测定 超高压高效液相色谱法》。其中，AOAC OM 960.46、AOAC OM 952.20 和 AOAC OM 986.23 均采用微生物法进行维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定。

AOAC OM 2011.10、AOAC OM 2011.16 和 AOAC OM 2014.02 分别采用配合维生素 B<sub>12</sub> 免疫亲和柱的高效液相色谱法、表面等离子共振法和配合维生素 B<sub>12</sub> 免疫亲和柱的超高压高效液相色谱法进行维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定。

## 四、标准的制（修）订与起草原则

本标准按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

本标准技术内容是采用 VitaFast®Vitamin B<sub>12</sub> 预包被微孔板式微生物法测定维生素 B<sub>12</sub>，并根据 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中附录-方法回收率，结合标准制定项目组以往起草国家标准和行业标准的经验，拟定了应用性验证评价方案并加以实施，对本标准的技术性能参数进行各项指标评估，并与现行国家标准 GB 5413.14-2010 和 GB/T 5009.217-2008 进行了性能比对。

## 五、确定各项技术内容的依据

本标准采用 VitaFast®Vitamin B<sub>12</sub> 预包被微孔板式微生物法测定维生素 B<sub>12</sub> 并对具体技术细节进行了补充和完善，参考了 GB 5413.14-2010 和 GB/T 5009.217-2008。

本标准的技术原理是利用维生素 B<sub>12</sub> 是莱士曼氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 生长所必需的营养素，将莱士曼氏乳酸杆菌预包被至微孔中，在微孔中加入培养基和梯度浓度的维生素 B<sub>12</sub> 标准品或适度稀释的待测样品，置 37℃ 避光培养 44 h~48 h，在波长 610 nm~630 nm 或 540 nm~550 nm 测定吸光度值，绘制标准曲线，根据标准曲线计算出待测样品中维生素 B<sub>12</sub> 的含量。

### 5.1 评估标准

根据 GB/T 27417-2017 附录-方法回收率，并结合实际经验，拟定了本标准检测方法的技术性能参数评估，以此来进行本标准检测方法的技术性能参数评估。

### 5.2 灵敏度

以检测限 (LOD) 作为灵敏度评价指标。检测限的计算公式为： $LOD = \bar{X} + 3 \times SD$ 。其中， $\bar{X}$  为重复测定零标准品吸光度平均值， $SD$  为重复测定零标准品的偏差。因此：

$$LOD = \bar{X} + 3 \times \sqrt{\frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

其中  $\bar{X}$  为重复测定零标准品的平均值， $n$  为测定次数。

取 10 个不含维生素 B<sub>12</sub> 的空白样品，分别采用 2 个不同批次的试剂盒。由 1 个实验员操作，每个样品取 3 份。按照本标准进行样品前处理和检测，本标准方法的定性检测限为 0.021

μg/100g。

### 5.3 稳定性

为评估本标准方法的稳定性,选择3个不同批次的试剂盒分别对不同浓度的婴幼儿配方奶粉、婴幼儿配方米粉、特殊医学用途配方食品、糖果、保健食品(片剂)和饮料进行检测,用变异系数作为稳定性的评估指标。本方法变异系数范围为2.0%~10.5%,符合技术性能评估标准的要求。

### 5.4 准确度和精密度

以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数(CV值)作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。变异系数范围为1.0%~2.9%,回收率范围为95%~112%,符合技术性能评估标准的要求。

### 5.5 与现行国家标准检测方法的比对实验

选择6个婴幼儿配方奶粉样品,同时采用本标准方法与GB 5413.14-2010,选择功能性饮料、医学用途牛奶、4等保健食品样品分别与GB/T 5009.217-2008进行检测和数据比较分析,以检测结果的相对偏差作为性能参数的评价指标。对婴幼儿配方奶粉采用本标准方法与GB 5413.14-2010,得到的检测结果相对偏差范围为-7.92%~7.81%,符合技术性能评估标准的要求。对功能性饮料、医学用途牛奶4个保健食品样品采用本标准方法与GB/T 5009.217-2008,得到的检测结果相对偏差范围为-20.7%~4.7%,符合技术性能评估标准的要求。

## 六、国际及国内验证

### 6.1 国内室外独立验证数据

#### 6.1.1 国家标准检测法与微孔板式微生物法的比较研究

分别使用国家标准GB 5413.14—2010与预包埋微孔板式微生物法对下表中所列6种食品样品中的维生素B<sub>12</sub>进行测定,将这两种方法的检测结果进行比较研究,包括回收率分析及线性分析,结果如下表。国标法GB 5413.14—2010测定维生素B<sub>12</sub>的回收率为94.6%~100.4%,微孔板式微生物法测定维生素B<sub>12</sub>的回收率为93.8%~98.6%,国标法的回收率略高于微孔板式微生物法,微孔板式微生物法的回收率均达到分析检测90%以上。

分别使用国标法GB 5413.14—2010与微孔板式微生物法对食品样品中的维生素B<sub>12</sub>进行测定,微孔板式微生物法的检测数据均与国标法GB 5413.14-2010的检测数据之间有很好的线性相关性。

#### 6.1.2 自然样品检测试验



选取多个种类共计65批食品样品，其中包括20批含有维生素B<sub>12</sub>的婴儿配方奶粉与45批不含维生素B<sub>12</sub>的食品样品，分别使用国标法GB 5413.14—2010 与预包埋微孔板式微生物法进行检测，将检测结果进行研究分析。试验结果表明，在含维生素B<sub>12</sub>食品样品及不含维生素B<sub>12</sub>食品样品的检测中，预包埋微孔板式微生物法的检测结果与国标法的检测结果均无显著性差异，符合率均达100%。

### 6.1.3 微孔板式微生物检测法评价试验

#### 6.1.3.1 耐变性试验

为研究培养温度和培养时间这2个变量对预包埋微孔板式微生物法的影响，进行耐变性试验，将维生素B<sub>12</sub>的标准品添加至不含维生素B<sub>12</sub>的基粉样品中，并配置成含有维生素B<sub>12</sub>的高浓度与低浓度的样品。使用预包埋微孔板式微生物法进行测定，将微孔板于37 °C下培养44 h和48 h；35 °C下培养44 h和48 h，每种测试条件5个平行进行试验，将检测结果进行研究分析。试验结果表明使用微孔板式微生物法时，培养温度和培养时间均会对检测结果构成一定的影响，培养条件之一（培养温度或培养时间）在一定区间内变化时，对检测结果的影响较小。

#### 6.1.3.2 批间变异试验

取3个不同批号的VitaFast® vitamin B<sub>12</sub>检测试剂盒进行试验。将维生素B<sub>12</sub>的标准品添加至不含维生素B<sub>12</sub>的基粉样品中，并配置成含有维生素B<sub>12</sub>的高浓度与低浓度的样品，每批试剂盒对每种浓度进行5个平行测试，测定平均值和标准偏差，将检测结果进行研究分析。经显著性差异分析，3个不同批号试剂盒的检测结果显示均无显著性差异，并且相对标准偏差RSD均小于10%，试验结果表明VitaFast® vitamin B<sub>12</sub>检测试剂盒质量稳定、均衡，不同批号的试剂盒对维生素B<sub>12</sub>的检测不构成影响。

#### 6.1.3.3 人员间比对试验

为研究不同操作人员在使用预包埋微孔板式微生物法时，因操作人员不同对检测结果造成的影响，选择3位检验员，选用同一批次的婴儿配方奶粉，分别使用预包埋微孔板式微生物法测定该样品中维生素B<sub>12</sub>的含量，5个平行进行测试，将检测结果进行研究分析。将3位检验员的检测结果进行显著性差异分析，经T检验，三组试验数据之间均无显著性差异。

## 6.2 FAPAS 全球范围内国际实验室能力验证数据

Fapas 是目前全球权威的实验室能力验证计划，该计划从 2007 年开始与 CNAS 互认。由英国政府食品和乡村事务部(Defra)的执行机构英国中心实验室（fera）组织。经UKAS(United Kingdom Accreditation Service)认可，由国际标准化组织向全球推荐（如 ISO 导则 43），已被全球食品链相关的分析实验室广泛采纳，与全球 100 多个国家的 3000 多家

实验室保持密切的联系。现在中国已有超过累计超过 300 家实验室参加。下表的不完全数据统计显示，12 家国际实验室使用 VitaFast® vitamin B<sub>12</sub> 预包埋微生物法维生素 B<sub>12</sub> 检测试剂盒分别参加五次 Fapas 国际能力验证，结果均为满意。

