

ICS 号:

CCS 号:

团体标准

T/CIFST XXX—20XX

食品中维生素 B₁₂ 的测定 预包被微孔板式微生物法

Determination of Vitamin B₁₂ in foods pre-coated microplate
microbiological method

(与国际标准一致性的标识)

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会 发布

前 言

本文件按照 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。

本文件使用了与 AOAC Official Method 960.46 Vitamin Assays Microbiological Methods 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》中一致的菌种，提取方法类似。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

食品中维生素 B₁₂ 的测定 预包被微孔板式微生物法

1 范围

本文件规定了食品中维生素 B₁₂ 的预包被微孔板式微生物测定方法。

本文件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、粮食和粮食制品，片剂、胶囊、粉剂类型保健食品、糖果的维生素 B₁₂ 含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

维生素 B₁₂ 是预包被在微孔中的莱士曼氏乳酸杆菌 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 生长所必需的营养素。在一定控制条件下，在维生素 B₁₂ 测定培养基中，莱士曼氏乳酸杆菌的生长与待测试样中维生素 B₁₂ 含量呈线性关系，根据吸光度值与标准工作曲线进行比较，即可计算出试样中维生素 B₁₂ 的含量。

4 试剂和材料

- 4.1 预包被微孔板式维生素 B₁₂ 微生物法试剂盒 (VitaFast®Vitamin B₁₂)：参见附录 A。
- 4.2 盐酸溶液 (HCl) (1 mol/L)：取 8.4 mL 浓盐酸 (37%)，用水定容至 100 mL。
- 4.3 氢氧化钠溶液 (NaOH) (1 mol/L)：称取 40.0 g NaOH，加水溶解并定容至 1000 mL，混合均匀。
- 4.4 高温淀粉酶 (1.5 U/mg)。
- 4.5 醋酸盐缓冲液 (pH 4.5)：称取 0.66 g 无水醋酸钠至 100 mL 烧杯中，加入约 50 mL 水溶解；加入 0.69 mL 冰醋酸 (99%)，调整 pH 值至 4.5，将溶液移至容量瓶中加水定容至 100 mL，此缓冲液可在 2 °C ~ 8 °C 下储存一周。
- 4.6 除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水。

5 仪器和设备

- 5.1 水浴锅：95 °C ± 1 °C。
- 5.2 恒温培养箱：37 °C ± 1 °C。
- 5.3 均质器。
- 5.4 超净工作台。
- 5.5 离心机：≥ 3500 × g。
- 5.6 酶标仪：波长 610 nm~630 nm 或 540 nm~550 nm。
- 5.7 涡旋混合器。

- 5.8 电子天平：感量 0.01 g。
- 5.9 微量可调单通道移液器及配套吸头：10 μ L~100 μ L、50 μ L~200 μ L、100 μ L~1000 μ L。
- 5.10 无菌离心管：1.5 mL~2mL、15 mL、50 mL。
- 5.11 锥形瓶：500 mL。
- 5.12 容量瓶：100 mL 和 1000 mL。
- 5.13 无菌注射器：10 mL。
- 5.14 无菌聚醚砜滤膜（PES）：0.22 μ m。

6 分析步骤

6.1 试样的制备

固体类试样需粉碎、研磨、过筛(筛板孔径 0.3 mm~0.5 mm)；半固体食品试样需匀浆混匀；液体试样用前振摇混合；胶质类口香糖和糖果试样，直接按照 6.2.5.操作。

6.2 试样的提取

6.2.1 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

称量 1 g（精确至 0.01 g）均质样品至 50 mL 无菌离心管中，加水至 40 mL，涡旋混匀后置 95℃ 水浴 30 min，期间颠倒混匀至少 5 次，确保离心管紧闭。水浴结束后冰浴迅速冷却到 30℃ 以下，用无菌注射器（5.13）和无菌滤膜（5.14）对样品液进行无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 倍的样品液。

6.2.2 饮料类

对固体饮料准确称量 1 g（精确至 0.01 g）均质样品，对液体饮料移取 1 mL 样品至 50 mL 无菌离心管中，加水至 40 mL，涡旋混匀后，用无菌注射器（5.13）和无菌滤膜（5.14）对样品液进行无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 倍的样品液。

6.2.3 粮食和粮食制品

准确称量 1 g（精确至 0.01 g）均质样品至 50 mL 无菌离心管中，加入 20 mL 水后用 HCl 溶液（4.2）调整 pH 至 4.5，或加入 20 mL pH 4.5 的醋酸盐缓冲液（4.5）后涡旋混匀。加入 300 mg 高峰淀粉酶（4.4），涡旋混匀后置 37℃ 暗处孵育 1 h（期间至少振荡 5 次）。加水至 40 mL，混合均匀后置 95℃ 水浴 30 min，期间颠倒混匀至少 5 次，确保离心管紧闭。水浴结束后冰浴迅速冷却到 30℃ 以下，用无菌注射器（5.13）和无菌滤膜（5.14）对样品液进行无菌过滤至 2 mL 离心管中。此为稀释倍数为 40 倍的样品液。

6.2.4 片剂、胶囊、粉剂类型保健食品

准确称量 1 g（精确至 0.01 g）均质后的片剂、粉剂或胶囊内容物至 500 mL 锥形瓶中，加入 400 mL 水混合均匀后置 95℃ 水浴 30 min，期间摇匀至少 5 次，水浴结束后冰浴迅速冷却到 30℃ 以下。将全部溶液转移至容量瓶中用水定容至 1000 mL。取 1 mL 溶液至一个 50 mL 离心管中，加水至 40 mL，涡旋混匀，用无菌注射器（5.13）和无菌滤膜（5.14）对样品液进行无菌过滤至 2 mL 离心管中。此为稀释倍数为 40000 倍的样品液。

注：若维生素 B₁₂ 含量较低，可适当调整 1000 mL 定容体积。

6.2.5 糖果

称取 15 g~20 g（精确至 0.01g）果味口香糖或糖果至 50 mL 无菌离心管中，加水至 40 mL，涡旋混匀后置 95℃ 水浴 30 min 溶解样品，期间颠倒混匀至少 5 次，确保离心管紧闭。水浴结束后冰浴迅速

冷却到 30 ℃ 以下，将全部溶液转移至容量瓶中并定容至 100 mL。移取相当于 1 g 样品的溶液至 50 mL 离心管中（例如，取样量为 17 g，100 mL/17 g=5.88 mL/g，相当于 1g 样品的体积为 5.88 mL），加至 40 mL，涡旋混匀，用无菌注射器（5.13）和无菌滤膜（5.14）对样品液进行无菌过滤至 2 mL 无菌离心管中。此为稀释倍数为 40 倍的样品液。

6.3 样品液的稀释

按照待测样品的标签值用无菌蒸馏水（附录 A1）进行适当的稀释，使样品液稀释后 B₁₂ 的含量落入标准曲线范围内。对样品液进行稀释时应逐级稀释，注意每次稀释不应大于 10 倍。

6.4 培养基的制备

用 10 mL 无菌蒸馏水（附录 A1）溶解瓶中的培养基干粉，盖紧瓶盖，涡旋振荡混匀。置 95 ℃ 水浴 5 min，期间颠倒混匀至少 2 次。水浴结束后冰浴迅速冷却到 30 ℃ 以下。用无菌注射器（5.13）和无菌滤膜（5.14）对培养基进行无菌过滤至 15 mL 无菌离心管中待用，现配现用。

6.5 标准稀释工作液的配制

根据标准品的标签说明，在标准品中加入相应体积的无菌蒸馏水（附录 A1），涡旋混匀得到标准品浓缩液。根据表 1 进行梯度标准稀释工作液的配制，现配现用。

表 1 梯度标准稀释工作液的配制

编号	浓度/μg/100 g (mL)	配制方法
标准稀释工作液 0	0	900 μL 无菌水+0 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 1	0.03	900 μL 无菌水+100 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 2	0.06	400 μL 无菌水+100 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 3	0.09	350 μL 无菌水+150 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 4	0.12	300 μL 无菌水+300 μL 标准品浓缩液
标准稀释工作液 5	0.18	200 μL 无菌水+400 μL 标准品浓缩液

6.6 加样和培养

6.6.1 微孔板的取用

按照每个标准稀释工作液和待测样品都设置三平行，取出所需数量的微孔板条并在微孔板架上固定，未使用的微孔板条立即放回原来的箔袋中，并与干燥剂一起重新封好，储存在 2 ℃~8 ℃ 条件下。

6.6.2 培养基的移取

移取 150 μL 无菌过滤后的维生素 B₁₂ 培养基至每个微孔中。

6.6.3 标准品和待测样品的移取

移取 150 μL 标准稀释工作液或待测样品液至微孔中，记录每个微孔所加的标准品或待测样品的编号。

6.6.4 微孔板的密封

根据使用微孔板条的数量，取出合适大小的粘合箔，去除粘合箔的保护膜后平放在微孔条上，用手将粘合箔平压，使其充分封闭微孔，特别注意微孔的边缘部分。

6.6.5 培养

将密封好的微孔板置于 37 °C 避光孵育 44 h~48 h。

6.6.6 测定

将微孔板倒置在桌面并紧贴桌面平行摇动，使微孔中的液体混匀。将微孔板翻转孔口朝上静置 10 s 后，以对角线方向缓慢撕下粘合箔，撕下粘合箔时应注意用手按住微孔板条边缘防止因粘合箔带动微孔条而造成微孔中液体溅出。撕下粘合箔后仔细检查微孔中的液体，如有气泡应用枪头戳破或用移液器吸除。用酶标仪于 610 nm~630 nm 或 540 nm~550 nm 波长下读取吸光值。

7 标准曲线绘制和结果计算

7.1 绘制标准曲线

计算梯度标准稀释工作液的三平行检测所测得的吸光值的算术平均值，结果保留三位有效数字。以梯度标准品维生素B₁₂含量做横坐标，以吸光值的平均值为纵坐标，使用RIDA® SOFT Win软件的四参数法绘制标准曲线。

7.2 结果计算和表述

计算待测样品液的三平行检测所测得的吸光值的算术平均值，结果保留三位有效数字。在标准曲线中代入待测样品液吸光值的平均值，求得待测样品液中维生素B₁₂的浓度。按照式（1）求得待测样品中维生素B₁₂的含量。

$$X = \frac{C_x}{m} \times d \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——待测样品中维生素 B₁₂ 的含量，单位为微克每百克或微克每百毫升（ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 或 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ）；

C_x ——待测样品液中维生素 B₁₂ 的浓度，单位为微克每百克或微克每百毫升（ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 或 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ）；

m ——待测样品的质量，单位为克（g）；

d ——稀释倍数。

注：根据 6.2 制备样品液时的 40 倍稀释倍数已经包括在标准曲线中。稀释倍数 d 只需考虑除此 40 倍以外的稀释倍数，例如 6.2.4 中额外的 1000 倍，或 6.3 中的稀释倍数。

8 质量控制

8.1 标准稀释工作液0的吸光值应小于标准稀释工作液1的吸光值，标准稀释工作液5的吸光值应大于0.6，否则表明实验失败。

8.2 标准曲线的相关系数不得低于0.99。

8.3 三平行的变异系数不应大于10%。

8.4 当待测样品液的吸光值小于标准稀释工作液 1 或大于标准稀释工作液 5 的吸光值时，不能使用标准曲线求得待测样品中维生素 B₁₂ 的含量，需调整稀释倍数重新检测，使待测样品液的吸光值落在标准曲线的定量范围内。

8.5 不同批号试剂盒中组分不得混用，超过有效期的试剂盒不得使用。

9 其他

本方法定性检测限为 0.021 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ，定量检测限为 0.03 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

CIFST

附 录 A

(规范性)

预包埋微孔板式维生素B₁₂微生物法检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

预包埋微孔板式维生素B₁₂微生物法检测试剂盒VitaFast®Vitamin B₁₂包括：

- a) 包被有菌种 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 的微孔板：12×8 孔；
- b) 无菌蒸馏水：30 mL/瓶×3 瓶；
- c) 维生素 B₁₂ 标准品（固态）：3 瓶；
- d) 粘合箔：3 片；
- e) 微孔板架：1 个。

A.2 试剂盒验收和保存

- a) 每个批号试剂盒应进行验收试验，验收需符合质量控制要求。
- b) 试剂盒于 2℃~8℃ 暗处避光保存，使用前回复至室温，使用后立即放回保存条件下。
- c) 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- d) 超过有效期的试剂盒不得使用。

A.3 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图A.1。

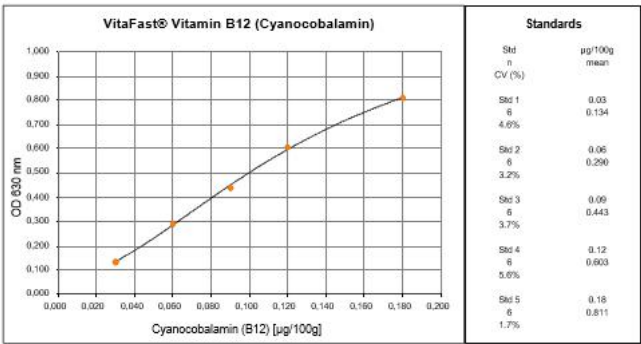


图 A.1 标准曲线谱图示例