

前 言

本标准等效采用美国公职分析化学师协会 (AOAC) 方法, 方法准确、灵敏度高。

本系列标准从实施之日起, 代替 GB 5413—1985。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位: 国家乳制品质量监督检验中心、浙江省轻工业研究所。

本标准参加起草单位: 卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢 (中国) 投资服务有限公司。

本标准主要起草人: 张玉杰、王芸、殷晓红、吕为群。

中华人民共和国国家标准

婴幼儿配方食品和乳粉

维生素 B₁₂ 的测定

Milk powder and formula foods for infant and young children
—Determination of vitamin B₁₂ content

GB/T 5413.14—1997

1 范围

本标准规定了用微生物法测定维生素 B₁₂ 的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中维生素 B₁₂ 的测定。

2 方法提要

莱士曼氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus leichmannii*) 对维生素 B₁₂ 的存在具有极高灵敏性。利用这种特异性可定量测出样品中维生素 B₁₂ 的含量。

3 试剂、菌种和培养基

所有试剂, 如未注明规格, 均指分析纯; 所有实验用水, 如未注明其他要求, 均指三级水。

3.1 生理盐水: 9g/L。

3.2 乙醇: 体积分数为 25%。

3.3 无水磷酸氢二钠。

3.4 无水偏重亚硫酸钠。

3.5 柠檬酸 (含一个结晶水)。

3.6 菌种: 莱士曼氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus leichmannii*)。

3.7 培养基。

3.7.1 乳酸杆菌琼脂培养基: 光解脲 15g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 10g, 番茄汁 100mL, 磷酸二氢钾 2g, 聚山梨糖单油酸酯 1g, 琼脂 10g, 蒸馏水 1000mL,

pH6.8±0.2 (25℃)。

3.7.3 维生素 B₁₂测定用培养基：无维生素酸水解酪蛋白 15g，葡萄糖 40g，天门冬酰胺 0.2g，柠檬酸钠 20g，抗坏血酸 4g，L-胱氨酸 0.4g，DL-色氨酸 0.4g，硫酸腺嘌呤 20mg，盐酸鸟嘌呤 20mg，尿嘧啶 20mg，黄嘌呤 20mg，核黄素 1mg，盐酸硫胺素 1mg，生物素 10 μg，烟酸 2mg，p-氨基苯甲酸 2mg，泛酸钙 1mg，盐酸吡哆醇 4mg，盐酸吡哆醛 4mg，盐酸吡哆胺 800 μg，叶酸 200 μg，磷酸二氢钾 1g，磷酸氢二钾 1g，硫酸镁 0.4mg，氯化钠 20mg，硫酸亚铁 20mg，硫酸锰 20mg，聚山梨糖单油酸酯 2g，蒸馏水 1000mL，pH6.0±0.2 (25℃)。

3.8 维生素 B₁₂：标准品。

4 仪器

常用实验室仪器及：

分光光度计。

5 制备

5.1 菌种的制备

5.1.1 将保存在直柱状乳酸杆菌琼脂培养基中的莱士曼氏乳酸杆菌接种到新的培养基中。培养后再转接一次，然后再将其从固体培养上转接到乳酸杆菌肉汤培养基中培养。

5.1.2 将乳酸杆菌肉汤中的培养液以 2000r/min 离心 2~3min，倾出上清液，加入 10mL 生理盐水 (3.1)，搅匀，再离心 2~3min，如此清洗 3~4 次，吸 0.4mL 该菌悬液于 10mL 盐水 (3.1) 中，待测。

5.1.3 用分光光度计，以生理盐水 (3.1) 做空白，于 550nm 波长下测 5.1.2 中菌悬液的透光率，此时应在 60%~80%之间。

5.2 标准溶液的制备

5.2.1 维生素 B₁₂中间贮备液，浓度为 100ng/mL。

精确称取维生素 B₁₂标准品，用乙醇(3.2)定容至维生素 B₁₂浓度为 100ng/mL。

5.2.2 维生素 B₁₂中间贮备液，浓度为 1ng/mL。

用乙醇 (3.2) 将 10mL 标准贮备液 (5.2.1) 定容至 1000mL。

5.2.3 标准工作液，分二个浓度：高浓度——维生素 B₁₂的浓度为 0.02ng/mL；低浓度——维生素 B₁₂的浓度为 0.01ng/mL。从中间液中 (5.2.2) 吸二个 5mL，用蒸馏水分别定容到 250mL 和 500mL。

6 操作步骤

6.1 样品的处理

6.1.1 无水磷酸氢二钠 (3.3) 1.3g，无水偏重亚硫酸钠 (3.4) 1.0g，柠檬酸 (含一个结晶水) (3.5) 1.2g，用 100mL 蒸馏水溶解。

6.1.2 称一定量的样品 (约含维生素 B₁₂50100ng)，用 10mL 的上述溶液 (6.1.1) 混合后，再加 150ml 蒸馏水，于 121℃ 水解 10min，冷却后调 pH 至 4.5，再用蒸馏水稀释，使最终溶液中维生素 B₁₂ 的质量浓度约在 0.01~0.02ng/mL，偏重亚硫酸钠的质量浓度小于 0.03mg/mL。

6.2 标准曲线的制备

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准溶液和维生素 B₁₂测定用培养基于培养管中，一式三份。

表 1

| 试管号 No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 蒸馏水, mL | 5 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |

| | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 标准溶液 ₁ , mL | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 |
| 培养基, mL | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 1) 试管 No. 3~7 中加低浓度标准溶液: No. 8~10 中加高浓度标准溶液。 | | | | | | | | | | |

6.3 测定液

按表 2 顺序加蒸馏水、样品溶液和维生素 B₁₂ 测定用培养基于培养管内，一式三份。

表 2

| | | | | |
|---------|---|---|---|---|
| 试管号 No. | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 蒸馏水, mL | 4 | 3 | 2 | 1 |
| 样品, mL | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 培养基, mL | 5 | 5 | 5 | 5 |

6.4 接种

将 6.2 和 6.3 中所有的试管于 121℃ 灭菌 5min，然后迅速冷却。将 6.1.2 中的菌悬液用毛细滴管向上述试管中各加 1 滴（其中标准曲线管中 No. 1 除外），混匀，37℃ ± 0.5℃ 培养 19~20h。

6.5 测定

以接种空白管做对照，测最高浓度标准样管的 T，二个小时后重新读，二次结果 T 值 ≤ 2%，则取出全部检验管测其 T，并记录。

7 分析结果的表述

以标样含维生素 B₁₂ 的量为横坐标，T 值为纵坐标做工作曲线。根据样品测得的 T 值，从标准曲线中查得维生素 B₁₂ 含量的平均值，再根据式 (1) 计算每百克（或毫升）样品中的实际含量：

$$\text{样品中维生素 B}_{12} [\mu\text{g}/100\text{g (mL)}] = \frac{x}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：x——从曲线中查得样品中维生素 B₁₂ 的平均含量，ng；

F——稀释因子；

m——样品的质量（或体积），g（或 mL）。

8 允许差

同一样品的两次测定值之差不得超过两次测定平均值的 10%。