



中华人民共和国国家标准

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

National food safety standard

Determination of vitamin B₁₂ in foods for infants and young children,
milk and milk products

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB/T 5413.14-1997《婴幼儿食品和乳粉 维生素B₁₂的测定》。

本标准与GB/T 5413.14-1997相比，主要变化如下：

——标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B₁₂的测定》。

本标准附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.14-1997。

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 原理

利用莱士曼氏乳酸杆菌（*Lactobacillus leichmannii*）对维生素 B₁₂ 的特异性和灵敏性，定量测定出试样中维生素 B₁₂ 的含量。在测定用培养基中供给除维生素 B₁₂ 以外的所有营养成分，这样微生物生长产生的透光率就会同标准曲线工作液及未知待测溶液中维生素 B₁₂ 的含量相对应。以不同浓度标准溶液的透光率相对于各浓度水平标准物质的浓度绘制标准曲线，根据标准曲线即可计算出试样中维生素 B₁₂ 的含量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 菌株：莱士曼氏乳酸杆菌（*Lactobacillus leichmannii*）ATCC 7830。

4.2 维生素 B₁₂（Vitamin B₁₂ 或 Cyanocobalamin）标准品：分子式 C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P，纯度 ≥99%。

4.3 培养基

4.3.1 乳酸杆菌琼脂培养基：见附录 A。

4.3.2 乳酸杆菌肉汤培养基：见附录 A。

4.3.3 维生素 B₁₂ 测定用培养基：见附录 A。

注：一些商品化合成培养基效果良好，商品化合成培养基按标签说明进行配制。

4.4 9 g/L 氯化钠溶液（生理盐水）

称取 9.0 g 氯化钠溶解于 1000 mL 水中，分装于具塞试管，每管 10 mL。121 °C 灭菌 15 min。

4.5 乙醇溶液：体积分数为 25 %。

4.6 无水磷酸氢二钠（Na₂HPO₄）。

4.7 无水偏重亚硫酸钠（Na₂S₂O₅）。

4.8 柠檬酸（含一个结晶水）（C₆H₈O₇·H₂O）。

4.9 标准溶液的制备

4.9.1 维生素 B₁₂ 贮备液（10 μg/mL）：精确称取维生素 B₁₂ 标准品（4.2），用乙醇溶液（4.5）定容至维生素 B₁₂ 浓度为 10 μg/mL。

4.9.2 维生素 B₁₂ 中间液 (100 ng/mL)：用乙醇溶液 (4.5) 将 5.0 mL 维生素 B₁₂ 贮备液 (4.9.1) 定容至 500 mL。

4.9.3 维生素 B₁₂ 工作液 (1 ng/mL)：用乙醇溶液 (4.5) 将 5.0 mL 维生素 B₁₂ 中间液 (4.9.2) 定容至 500 mL。

4.9.4 标准曲线工作液：分别吸取两个 5 mL 维生素 B₁₂ 工作液 (4.9.3) 于 250mL 和 500mL 容量瓶中，用水定容至刻度。高浓度溶液的浓度为 0.02 ng/mL；低浓度溶液的浓度为 0.01 ng/mL。

注：所有标准溶液要储存于冰箱内。4.9.1、4.9.2 和 4.9.3 保存期三个月，4.9.4 临用前配制。

5 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

5.1 天平：感量为 0.1 mg。

5.2 pH 计：精度 ≤ 0.01。

5.3 分光光度计。

5.4 涡旋混合器。

5.5 离心机：转速 ≥ 2000 转/分钟。

5.6 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。

5.7 冰箱：2 °C ~ 5 °C。

5.8 无菌吸管：10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器和吸头。

5.9 瓶口分液器：0 mL ~ 10 mL。

5.10 锥形瓶：200 mL。

5.11 容量瓶 (A 类)：100 mL, 250 mL, 500 mL。

5.12 单刻度移液管 (A 类)：容量 5 mL。

5.13 漏斗：直径 90 mm。

5.14 定量滤纸：直径 90 mm。

5.15 试管：18 mm × 180 mm。

注：准备玻璃仪器时，使用活性剂对硬玻璃测定管及其他必要的玻璃器皿进行清洗，清洗之后要求在 200 °C 干热 2 h。

6 分析步骤

6.1 测试菌液的制备

6.1.1 将莱士曼氏乳酸杆菌 (ATCC 7830) 的冻干菌株 (4.1) 活化后，接种到乳酸杆菌琼脂培养基 (4.3.1) 上，36 °C ± 1 °C 培养 24 h。再转种 2 代 ~ 3 代来增强活力。置 2 °C ~ 5 °C 冰箱保存备用。每 15 d 转种一次。

6.1.2 将活化后的菌株接种到乳酸杆菌肉汤培养基 (4.3.2) 中，36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~ 24 h，以 2000 转/分钟离心 2 min ~ 3 min，弃去上清液，加入 10 mL 生理盐水 (4.4)，混匀，再离心 2 min ~ 3 min，弃去上清液，再加入 10 mL 生理盐水 (4.4)，混匀。如前离心操作，弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水 (4.4)，混匀。吸适量该菌悬液于 10 mL 生理盐水 (4.4) 中，混匀制成测试菌液。

6.1.3 用分光光度计 (5.3)，以生理盐水 (4.4) 做空白，于 550 nm 波长下测测试菌液 (6.1.2) 的透光率，使其透光率在 60 % ~ 80 % 之间。

6.2 试样的处理

6.2.1 称取无水磷酸氢二钠(4.6) 1.3 g, 无水偏重亚硫酸钠(4.7) 1.0 g, 柠檬酸(含一个结晶水)(4.8) 1.2 g, 用 100 mL 水溶解。

6.2.2 称一定量的样品(精确到 0.0001 g), 含维生素 B₁₂ 约 50 ng~100 ng, 用 10 mL 的上述溶液(6.2.1) 混合后, 再加 150 mL 水, 于 121 °C 水解 10 min, 冷却后调 pH 至 4.5 ± 0.2, 再用水定容至 250 mL, 过滤。移取滤液 5 mL, 加入水 20 mL~30 mL, 调 pH 至 6.8 ± 0.2, 用水定容至 100 mL。最终溶液中维生素 B₁₂ 的质量浓度约在 0.01 ng/mL~0.02 ng/mL, 偏重亚硫酸钠的质量浓度小于 0.03 mg/mL。

6.3 标准曲线的制作

按表 1 顺序加入水、标准曲线工作液(4.9.4) 和维生素 B₁₂ 测定用培养基(4.3.3) 于培养管中, 一式三份。

表1 标准曲线的制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
水(mL)	5	5	4	3	2	1	0	2	1	0
0.01 ng/mL标准曲线工作液(mL)	0	0	1	2	3	4	5	0	0	0
0.02 ng/mL标准曲线工作液(mL)	0	0	0	0	0	0	0	3	4	5
培养基(mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

6.4 待测液的制作

按表 2 顺序加水、样品溶液(6.2.2) 和维生素 B₁₂ 测定用培养基(4.3.3) 于培养管内, 一式三份。

表2 待测液的制作

试管号	1	2	3	4
水(mL)	4	3	2	1
待测液(mL)	1	2	3	4
培养基(mL)	5	5	5	5

6.5 灭菌

将 6.3 和 6.4 中所有的试管盖上试管帽, 121 °C 灭菌 5 min (商品培养基按标签说明进行灭菌)。

6.6 接种

将上述试管迅速冷却至 30 °C 以下。用滴管或移液器向上述试管中各滴加 1 滴(约 50 μL) 测试菌液(6.1.2) (其中标准曲线管中空白 S1 除外)。

6.7 培养

将试管放入恒温培养箱内, 36 °C ± 1 °C 培养 19 h~20 h。

6.8 测定

培养结束后, 对每支试管进行目测检查, 未接种试管 S1 内培养液应是澄清的, 如果出现浑浊, 则测定无效。

6.8.1 以接种空白管做对照, 测定最高浓度标准曲线试管的透光率, 2 h 后重新测定。两次结果透光率差值若小于 2 %, 则取出全部检验管测其透光率。

6.8.2 用未接种空白试管(S1) 作空白, 将分光光度计透光率调到 100 % (或吸光度为 0), 读出接种空白试管(S2) 的读数。再以接种空白试管(S2) 为空白, 调节透光率为 100 % (或吸光度为 0), 依次读出其他每支试管的透光率(或吸光度)。

6.8.3 用涡旋混合器(5.4)充分混合每一支试管(也可以加一滴消泡剂)后,立即将培养液移入比色皿内进行测定,波长为550 nm,待读数稳定30 s后,读出透光率,每支试管稳定时间要相同。以维生素B₁₂标准品的含量为横坐标,透光率为纵坐标作标准曲线。

6.8.4 根据待测液的透光率,从标准曲线中查得该待测液中维生素B₁₂的浓度,再根据稀释因子和称样量计算出试样中维生素B₁₂的含量。透光率超出标准曲线管S 3~S 10范围的试样管要舍去。

6.8.5 对每个编号的待测液的试管,用每支试管的透光率计算每毫升该编号待测液维生素B₁₂的浓度,并计算该编号待测液的维生素B₁₂浓度平均值,每支试管测得的该浓度不得超过该平均值的±15%,超过者要舍去。如果符合该要求的管数少于所有的四个编号的待测液的总管数的2/3,用于计算试样含量的数据是不充分的,需要重新检验。如果符合要求的管数超过原来管数的2/3,重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液中维生素B₁₂含量的平均值,以此平均值计算全部编号试样管的总平均值为C_x。用于计算试样中的维生素B₁₂含量。

注:绘制标准曲线,既可读取透光率(T%),也可读取吸光度(A)。

7 分析结果的表述

试样中维生素B₁₂的含量按公式(1)计算:

$$X = \frac{C_x}{m} \times \frac{f}{1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中维生素B₁₂的含量,单位为微克每百克表示(μg/100 g);

C_x——6.8.5中计算所得的总平均值,单位为纳克(ng);

m——试样的质量,单位为克(g);

f——稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留两位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

9 其他

本标准检出限为0.1 μg/100g。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 乳酸杆菌琼脂培养基

A.1.1 成分

番茄汁 100 mL, 三号蛋白胨 7.5 g, 酵母浸膏 7.5 g, 葡萄糖 10.0 g, 磷酸二氢钾 2.0 g, 聚山梨糖单油酸酯 1.0 g, 琼脂 14.0 g, 水 1000 mL, pH 6.8 ± 0.1 (25 °C ± 5 °C)。

A.1.2 制法

先将除琼脂以外的其他成分溶解于蒸馏水中, 调节 pH, 再加入琼脂, 加热煮沸至完全溶解。混合均匀后分装试管, 每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

A.2 乳酸杆菌肉汤培养基

A.2.1 成分

番茄汁 100 mL, 三号蛋白胨 7.5 g, 酵母浸膏 7.5 g, 葡萄糖 10.0 g, 磷酸二氢钾 2.0 g, 聚山梨糖单油酸酯 1.0 g, 水 1000 mL, pH 6.8 ± 0.1 (25 °C ± 5 °C)。

A.2.2 制法

先将上述成分 (A.2.1) 溶解于水中, 调节 pH, 加热煮沸, 混合均匀后分装试管, 每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

A.3 维生素 B₁₂ 测定用培养基

A.3.1 成分

无维生素酸水解酪蛋白 15.0 g, 葡萄糖 40.0 g, 天门冬酰胺 0.2 g, 醋酸钠 20.0 g, 抗坏血酸 4.0 g, L-胱氨酸 0.4 g, DL-色氨酸 0.4 g, 硫酸腺嘌呤 20.0 mg, 盐酸鸟嘌呤 20.0 mg, 尿嘧啶 20.0 mg, 黄嘌呤 20.0 mg, 核黄素 1.0 mg, 盐酸硫胺素 1.0 mg, 生物素 10.0 μg, 烟酸 2.0 mg, p-氨基苯甲酸 2.0 mg, 泛酸钙 1.0 mg, 盐酸吡哆醇 4.0 mg, 盐酸吡哆醛 4.0 mg, 盐酸吡哆胺 800.0 μg, 叶酸 200.0 μg, 磷酸二氢钾 1.0 g, 磷酸氢二钾 1.0 g, 硫酸镁 0.4 g, 氯化钠 20.0 mg, 硫酸亚铁 20.0 mg, 硫酸锰 20.0 mg, 聚山梨糖单油酸酯 (吐温 80) 2.0 g, 水 1000 mL, pH 6.0 ± 0.1 (25 °C ± 5 °C)。

A.3.2 制法

将上述成分溶解于水中, 调节 pH, 备用。
