



维生素B₁₂微孔板法即用型试剂盒 (产品货号: GVT2002)

版本GFAD [01]09.22

1. 简介

本产品是根据国标GB 5009.285-2022《食品安全国家标准 食品中维生素B₁₂的测定》“第三法 微生物法”研制的维生素B₁₂检测微孔板法即用型试剂盒，每盒产品包含3套试剂。

2. 检测原理

维生素B₁₂是莱士曼氏乳酸杆菌*Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 生长所必需的营养素，在一定控制条件下，将莱士曼氏乳酸杆菌菌液接种至含有试样液的培养液中，培养一段时间后测定透光率（或吸光度值），根据维生素B₁₂含量与透光率（或吸光度值）的标准曲线计算出试样中维生素B₁₂的含量。

3. 试剂盒组成

维生素B ₁₂ 标准品（冻干）	3瓶	无菌水（30mL）	3瓶
维生素B ₁₂ 检测菌球（冻干）	3瓶	无菌96微孔板	3块
维生素B ₁₂ 测定培养基基础（20 mL）	3瓶	封板膜	3片
维生素B ₁₂ 测定培养基添加剂（冻干）	3瓶		

4. 贮藏条件：于2-8℃避光保存一年。

5. 其他试剂、耗材和设备（本试剂盒不提供）

5.1 无菌工作台（无菌操作时使用）	5.6 涡旋振荡器
5.2 恒温培养箱，36℃±1℃	5.7 移液枪及无菌枪头，10-100 μL，100-1000 μL
5.3 酶标仪（540nm~610nm）	5.8 三角瓶和容量瓶
5.4 高压灭菌锅	5.9 无菌离心管：1.5 mL，15 mL（需带有旋转盖）
5.5 超声波振荡器	5.10 无菌注射器与0.22 μm无菌滤膜

6. 测定培养基制备（无菌操作）

- 6.1 制备维生素B₁₂测定培养基：移取1.0mL维生素B₁₂测定培养基基础加入维生素B₁₂测定培养基添加剂中，溶解3min，使其充分混匀，全部转入20 mL维生素B₁₂测定培养基基础中，混匀。
- 6.2 不接种标准0对照管培养基：取上述培养基500μL于1.5mL无菌离心管中，作为不接种标准0对照管S1用培养基。
- 6.3 接种维生素B₁₂测定培养基：取1瓶维生素B₁₂检测菌球，加入制备好的维生素B₁₂测定培养基（6.1）中，混匀后即可使用。

7. 标准系列管制备（无菌操作）：

本产品提供以下2种标准系列管制备方法，“方法一”与国标法步骤一致，“方法二”省去标准工作液稀释步骤，两种方法制备的标准系列管维生素B₁₂含量完全相同，操作时可视情况二选一。

方法一：准确吸取1.1 mL无菌水于维生素B₁₂标准品中，溶解后充分混匀，取1mL加入4mL无菌水中，混匀，即为维生素B₁₂标准工作液。取10个1.5 mL无菌离心管，按表1-1配制系列浓度标准溶液。

表1-1 标准曲线的制作

标准品管序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
维生素B ₁₂ 含量/ng	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10
标准溶液/μL	0	0	100	200	300	400	500	600	800	1000
无菌水/μL	1000	1000	900	800	700	600	500	400	200	0

方法二：准确吸取1.1 mL无菌水于维生素B₁₂标准品中，溶解后充分混匀。取10个1.5 mL无菌离心管，按表1-2配制系列浓度标准溶液。

表1-2 标准曲线的制作

标准品管序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
维生素B ₁₂ 含量/ng	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10
标准溶液/μL	0	0	20	40	60	80	100	120	160	200
无菌水/μL	1000	1000	980	960	940	920	900	880	840	800

8. 试样系列管制备

- 8.1 试样按照GB 5009.285-2022“第三法 微生物法”对应的步骤“19.2”进行前处理。
- 8.2 将制备好的试样稀释液无菌条件下用无菌水相滤膜（0.22μm）过滤除菌，按照表2顺序制备试样系列管。

表2 试样管的制备

试样管序号	1	2	3	4
试样溶液/ μL	100	200	300	400
无菌水/ μL	400	300	200	100

9. 检测步骤 (无菌操作)

- 9.1 取出无菌微孔板, 记录板孔位置, 标准溶液和试样稀释液每个梯度分别做3孔平行试验。
- 9.2 在每个微孔中加入150 μL 制备好的接种维生素B₁₂测定培养基 (6.3), 其中不接种标准0管对照S1加入150 μL 未接种维生素B₁₂测定培养基 (6.2)。
- 9.3 吸取150 μL 标准系列管 (7) 或试样系列管 (8.2) 至指定微孔中。
- 9.4 用封板膜密封微孔条上的各个微孔, 按压封板膜, 保证各个微孔充分密闭 (特别注意微孔的边缘部分应充分密封)。

10. 培养

将微孔板置于36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中避光培养40-48 h。

11. 测定

- 11.1 取出微孔板, 再次按压封板膜, 保证封板膜充分密封各个微孔, 反复颠倒振荡, 混匀微孔板中培养物。
- 11.2 对角揭开封板膜, 用针刺破各微孔表面的气泡。
- 11.3 用酶标仪在550 nm处测定吸光度值。
如果0对照孔出现浑浊, 说明可能有杂菌污染, 需重做试验。

12. 分析结果表述

按照国标GB 5009.285-2022中“20 分析结果的表述”进行结果分析。

- 12.1标准曲线: 以标准系列管中维生素B₁₂浓度为横坐标, 每个标准点透光率 (或吸光度) 为纵坐标, 绘制标准曲线。
- 12.2试样结果计算:

根据待测液的透光率 (或吸光度), 从标准工作曲线中计算该待测液中维生素B₁₂浓度, 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 (或吸光度) 超出标准曲线管S3~S10范围的测试值要舍去。

用每个微孔的透光率 (或吸光度) 计算每毫升每个编号待测液中维生素B₁₂的浓度, 并计算该编号待测液维生素B₁₂的浓度平均值, 每个微孔测得的浓度不得超过该平均值的15%, 超过者要舍去。如果符合该要求的孔数少于所有的四个编号的待测液的总孔数的2/3, 用于计算试样含量的数据是不充分的, 需要重新检验。如果符合要求的孔数超过原来孔数的2/3, 重新计算每个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孔的总平均值为 ρ 。用式 (1) 计算试样中维生素B₁₂的含量X:

试样中维生素B₁₂ (以氰钴胺素计) 的含量按式 (1) :

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

- X —— 样品中维生素B12的含量, 单位为 $\mu\text{g}/100\text{g}(\text{mL})$;
- ρ —— 有效试样管中维生素B12浓度的总平均值, 单位为 ng/mL ;
- f —— 样液稀释倍数;
- 100 —— 换算系数;
- m —— 试样质量, 单位为g;
- 1000 —— 换算系数。

12.3 说明:

计算结果保留三位有效数字。
注: 液体试样叶酸含量也可以微克每百毫升 ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) 为单位。
精密度、检出限和定量限参考国标。

北京陆桥技术股份有限公司

地址: 北京市朝阳区高碑店北路甲3号 (100123)
山东: 青岛市市北区台柳路177号和达中心A座703室 (266033)
广东: 广州市番禺区石北工业路金河产业园A栋东4楼 (511400)
东北: 哈尔滨市松北区科技创新城创新一路2727号国乳中心808室
成都: 四川省成都高新西区中海国际橙郡一期1栋1单元204 (610096)
上海: 上海市漕河泾松江新兴产业园区研展路455号B座4层406室
销售热线: 010-51203999 0532-82689263
020-38011430 0451-87821139
网 址: www.beijinglandbridge.com
E- mail: tech_e@beijinglandbridge.com