

食品中 $V_{B_{12}}$ 检测方法研究进展

周迅雷, 张志国, 褚庆环, 生庆海, 张佳程

(青岛农业大学食品学院, 山东 青岛, 266109)

摘 要 $V_{B_{12}}$ 是重要的 B 族维生素, 在食品中的含量很低。文中论述了近年来 $V_{B_{12}}$ 检测方法的研究现状, 分析了各种检测方法的特点, 并根据食品特点对 $V_{B_{12}}$ 检测方法的发展提出了展望。

关键词 $V_{B_{12}}$, 钴胺素, 检测方法

$V_{B_{12}}$, 即氰钴胺素(cyanocobalamine)。主要存在于动物性食品中, 如内脏、瘦肉、鱼、牛乳以及蛋黄等。 $V_{B_{12}}$ 在食品中含量很低, 为 10^{-9} 级, 在强化 $V_{B_{12}}$ 的婴儿配方乳粉中按照国家标准要求也仅大于或等于 1.2 ng/g 。所以不论是普通食品还是营养强化食品, 准确测定 $V_{B_{12}}$ 的含量都比较困难。因此探索更好的方法, 能够快速准确地测定 $V_{B_{12}}$ 的含量已成为一种需要。

$V_{B_{12}}$ 的检测方法经过多年研究, 已有多种方法。包括比色法、化学发光分析法、荧光分析法、毛细管电泳法、高效液相色谱法、原子吸收光谱法、同位素标记测定法、免疫分析法、质谱法等。

1 当前 $V_{B_{12}}$ 检测方法的研究进展

1.1 微生物分析法

$V_{B_{12}}$ 对于某些微生物如 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC7830) 的正常生长是必需的, 在一定条件下, 通过微生物的生长与繁殖速度的强度可间接地测定样品中 $V_{B_{12}}$ 的含量。微生物法灵敏度高, 检出限低, 设备要求简单, 是目前婴儿配方乳粉中 $V_{B_{12}}$ 检测的国家标准方法。微生物法测定实验中所用药品较多。培养基成分复杂, 且需酸解预处理。另外, 菌种制备麻烦, 该菌种生命力不强, 每周需要至少传代 2~3 次, 否则极易死亡。实验前 1 d 必须传种 1 次。种子培养液制备时需要小心谨慎, 加入的 $V_{B_{12}}$ 要适量, 少则影响生长, 多则光密度过大, 影响测量。因此该方法费时费力, 不够精确, 操作复杂需要专门技术与经验。且不能区分 $V_{B_{12}}$ 及其类似物, 造成测定结果偏高。

1.2 导数分光光度法

导数分光光度法是在分光光度法的基础上建立起来的, 把吸收光谱写成波长的函数: $A = \epsilon lc = \epsilon(\lambda)c$, 那么它的导函数图象就是导数光谱。它可分为一阶、二阶、三阶导数光谱。导数图象可将重叠峰分开、锐化, 从而能够明显地识别。但是导数分光光度法不适合食品类等复杂基质的样品, 因为有太多的物质一起出峰, 不是简单的几次求导就能区分的。

1.3 化学发光分析法

化学发光(chemiluminescence, 简称 CL)分析法是分子发光光谱分析法中的一类, 是根据化学发光反应在某一时刻的发光强度或发光总量来确定组分含量的分析方法。它基于某些试剂能与 $V_{B_{12}}$ 反应发光的原理建立。激发光的强度与 $V_{B_{12}}$ 的含量成线性关系, 通过测定发光强度可以得到 $V_{B_{12}}$ 的含量。Song 等人^[1]报道了一种化学发光分析法, 二价钴离子与发光氨和溶解氧混合产生化学发光反应。化学发光的强度增加与 $V_{B_{12}}$ 的浓度成正比。该实验使用了流动注射系统, 检测限能达到 0.05 pg/mL 。罗福东等人^[2]使用化学发光免疫分析法检测了血清中的 $V_{B_{12}}$, 并达到了 57 pg/mL 的灵敏度。这是在化学发光反应及抗原-抗体特异性识别基础上建立起来的一种新的非放射免疫分析技术-化学发光免疫分析法, 其反应原理与放射性免疫法和酶联免疫吸附试验的双抗体夹心法、竞争法类似。化学发光法操作简单, 消耗试剂少, 灵敏性高, 发射光强度测量无干扰, 特异性强, 精密度好。缺点是所用的成套仪器昂贵, 并且食品基质复杂, 基质中的无机钴常常对测定结果产生干扰, 往往使检测结果呈现正偏差。

1.4 荧光分析法

荧光分析法是某些物质被入射光照射后, 可以发射出比原激发光波长更长的荧光, 通过测量荧光强度进行定量分析的方法。 $V_{B_{12}}$ 结构复杂, 其吡咯环下方

第一作者: 硕士研究生(褚庆环为通讯作者)。

收稿日期: 2008-05-14, 改回日期: 2008-09-16

的二甲基苯并咪唑环在 303 nm 处有荧光发射。但是 $V_{B_{12}}$ 整体并不显示出明显的荧光性。因此一般对其进行衍生或转化从而得到能够产生荧光的物质。Pakin 等人^[3]用胃蛋白酶处理食品样品,释放出与蛋白紧密结合的 $V_{B_{12}}$,然后使用亲和免疫吸附柱纯化,去除杂质干扰。再将 $V_{B_{12}}$ 转化为 α -核唑,然后通过高效液相色谱分离,使用荧光检测器检测,得到较好的回收率(95%~100%)和较低的检出限(3ng/g)。Sun 等人^[4]报道了一种新方法:四碘荧光素钠(ES)加上羟丙基- β -环糊精以增强其荧光性,然后加入 $V_{B_{12}}$ 可淬灭荧光,荧光的淬灭值 ΔF 与 $V_{B_{12}}$ 的含量成线性关系。荧光分析法便捷、灵敏度高,所需仪器较为常见,但是在荧光衍生和转化过程中有干扰物质存在,需要有针对性的纯化手段。

1.5 高效毛细管电泳法(HPCE)

高效毛细管电泳是近年来发展起来的一种分离、分析技术,它是凝胶电泳技术的发展,是高效液相色谱分析的补充。该技术根据不同分子所带电荷性质、多少不同,形状、大小各异。在一定电解质及 pH 的缓冲液或其它溶液内,受电场作用,样品中各组分按一定速度迁移,从而形成电泳,并逐个通过检测点。高效毛细管电泳的分离能力很强,常与其他仪器联用。Baker 等人^[5]通过使用毛细管电泳与电感耦合等离子体质谱联用(CE-ICP-MS)技术测定食品样品中的 $V_{B_{12}}$,认为尽管这种方法缺少微生物法和放射免疫法的灵敏性,但是它提供了极好的选择性,它能很好地将 $V_{B_{12}}$ 的 4 种形式与类似物都分离出来。并且这种方法快捷、有效,是一种较好的常规检测方法。它的缺点是最低检出限较高,该文所得为 50 ng/mL。

1.6 原子吸收光谱法

原子吸收光谱法通过测定 $V_{B_{12}}$ 中的钴含量,换算出 $V_{B_{12}}$ 的含量。李海涛等人^[6]研究利用食品中 $V_{B_{12}}$ 中心的配位金属钴,对样品进行消化预富集浓缩后用火焰原子吸收光谱法测定样液中的钴含量,从而间接地测定样品中 $V_{B_{12}}$ 的含量。该方法利用浊点萃取富集测试样液中的钴,避免了食品中高浓度盐对原子吸收光谱法的干扰,同时大大提高了检测灵敏度。Kunihiko 等人^[7]预先通过添加 8-喹唑啉与钴离子共沉富集浓缩,然后使用固体进样技术进入石墨炉电热原子吸收光谱仪,测定 $V_{B_{12}}$ 中的钴。最低检出限可达 0.15ng/mg。原子吸收光谱法快捷、简便、灵敏度高,检出限低,是目前较为实用的检测方法。但是这种方法易受无机钴元素的干扰。因此采用合适的样品前

处理方法排除杂质相当重要。

1.7 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相法是目前测定 $V_{B_{12}}$ 最有效的分析方法,它快速、灵敏、分离性强,测定准确。并且在检测时需要的样品量少,易与其他技术联用,如 HPLC-MS, HPLC-AAS 等。另外,它自身常配有紫外、荧光、电化学等多种检测器,可在不同方法中灵活使用高效液相色谱仪。鲁杰等^[8]采用了固相萃取技术(SPE)进行试样富集、净化,高效液相色谱进行分离检测。方法的最小检出量为 0.3ng,最低检出浓度为 0.2 mg/kg。平均回收率为 72.1%~131.7%。Heudi 等人^[9]利用 pH 4.0 的醋酸钠缓冲液处理样品,并加入氰化钠、 α -淀粉酶与胃蛋白酶提取 $V_{B_{12}}$,经过免疫吸附柱纯化,在高效液相上检测出 $V_{B_{12}}$ 的含量。最低检出限可达 3ng/mL。HPLC 能有效分离不同物质,通过调整实验条件,得到较好的 $V_{B_{12}}$ 出峰,因此测定的结果可以排除干扰,极为精确。

1.8 免疫分析法

免疫分析法是基于抗体与抗原之间的高选择性反应而建立起来的一种生物化学分析法。具有很高的选择性和很低的检出限,可以应用于测定各种抗原、半抗原或抗体。已有商品化的免疫分析仪。如罗福东等人^[2]应用 Bayer CENTAUR 全自动化学发光免疫分析仪检测血液中的 $V_{B_{12}}$ 含量,检测限能达到 57pg/mL。杨芝红等人^[10]应用了 Axsym 全自动免疫分析仪快速检测了血清中的 $V_{B_{12}}$,检测限达到 60pg/mL。免疫分析法分为荧光免疫法、发光免疫法、酶免疫法及电化学免疫法等非放射性免疫法。放射免疫分析法的灵敏度最高,是在待测分析物中加入理化性质、免疫学特性与分析物相同的放射性同位素标记的分析物。该分析物与特异性抗体结合,用测量放射性的方法,测量并计算结合部分与游离部分的比值,从而确定分析物的量。但是放射性免疫法易造成放射性污染,目前较少使用。非放射性免疫分析法是使用荧光基团、化学发光或生物发光组分以及酶作为免疫标记,已成为 $V_{B_{12}}$ 检测的重要方法。

1.9 质谱分析法

目前利用质谱法检测 $V_{B_{12}}$ 大都与其他分离方法联用,质谱只是作为检测器使用。Luo 等人^[11]应用 HPLC-ESI-MS 分析了食品与药片剂中 $V_{B_{12}}$,并用人参皂苷 Re 作为内标物,取得了很好的效果。质谱分析法特点突出,灵敏度高,进样量少,可确定物质分子式,是分析、鉴定复杂混合物的最有效工具。质谱检

测器还有基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS);等离子解析质谱(PDMS)。联用技术有毛细管电泳与电感耦合等离子体质谱联用法(CE-ICP-MS);高效液相与电喷雾质谱联用法(HPLC-ESI-MS)。

2 检测方法存在的问题与发展趋势

从1948年 $V_{B_{12}}$ 被发现定名至今,其检测技术经过漫长发展,形成了上述多种检测方法。但是, $V_{B_{12}}$ 在食品中含量很低,而且 $V_{B_{12}}$ 的存在形态多样,相似物质也有干扰。对于精确测定有很大困难。所以很多传统的方法不能够很好地测定食品中 $V_{B_{12}}$ 的含量。国内外最新的研究包括2类,一类是免疫分析,基于抗原抗体的原理做成免疫分析盒,将 $V_{B_{12}}$ 单独吸附固定,然后通过化学反应使得仪器能够检测出。这类方法快速精确,但成本相对很高,需要购买试剂盒与配套仪器。另一类是高效液相色谱法,在现今检测分析中,高效液相以其快捷准确,适用范围广的巨大优势成为主流检测方法,基于它的 $V_{B_{12}}$ 检测方法也是研究的前沿与重点,在实验前处理中结合使用亲和免疫吸附柱纯化 $V_{B_{12}}$ 已成为新的热点。就发展趋势来看,仪器分析法发展较快,检测结果越来越精确,且利于形成标准并推广。发达国家研究多年,已经推出成熟的商品化全自动免疫分析仪。目前,各种检测手段向专业化发展的同时也在互相交叉,结合成为更有效的方法。

参 考 文 献

- 1 Song Zhenghua, Hou Shuang. Sub-picogram determination of Vitamin B_{12} in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 488: 71~79
- 2 罗福东,潘婉仪,周强. 化学发光免疫分析法检测黄体生成素、 $V_{B_{12}}$ 和癌胚抗原的性能评价[J]. *江西医学检验*, 2006, 24(5): 431~432
- 3 Pakin C, Bergaentzlé M, Aoudé-Werner M et al. α -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B_{12} in foodstuffs[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1081: 182~189
- 4 Sun Jing, Zhu Xiashi, Mu Ming. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin enhanced determination for the vitamin B_{12} by fluorescence quenching method[J]. *J Fluoresc*, 2007, 17: 265~270
- 5 Baker S A, Miller-Ihli N J. Determination of cobalamins using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Spectrochimica Acta Part B*, 2000, 55: 1823~1832
- 6 李海涛,汤 肇,于 村,等. 浊点萃取-原子吸收法间接检测食品中 $V_{B_{12}}$ 方法的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(7): 821~822
- 7 Kunihiro Akatsuka, Ikuo Atsuya. Determination of vitamin B_{12} as cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry using the solid sampling technique[J]. *Fresenius Z Anal Chem*, 1989, 335: 200~204
- 8 鲁 杰,杨大进,王竹天. 固相萃取-高效液相色谱法测定保健食品中 $V_{B_{12}}$ 的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(4): 324~328
- 9 Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P, et al. Determination of Vitamin B_{12} in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1101: 63~68
- 10 杨芝红,张毓洪,白永泽. Axsym 仪快速检测血清叶酸、 $V_{B_{12}}$ 的临床意义[J]. *宁夏医学院学报*, 2004, 26(5): 362~363
- 11 Luo Xubiao, Chen Bo, Ding Li, et al. HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B_{12} in food products and in multivitamins-multimineral tablets[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 562: 185~189
- 12 刘约权. 现代仪器分析[M]. 北京:高等教育出版社, 2001
- 13 郑建仙. 功能性食品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999
- 14 Michael Vogeser, Stefan Lorenzl. Comparison of automated assays for the determination of vitamin B_{12} in serum[J]. *Clinical Biochemistry*, 2007, 40: 1342~1345
- 15 Fortuna Riccio, Carmela Mennella, Vincenzo Fogliano. Effect of cooking on the concentration of vitamins B in fortified meat products[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41: 1592~1595
- 16 Yoshio Hisaeda, Takuya Nishioka, Yoshiki Inoue et al. Electrochemical reactions mediated by vitamin B_{12} derivatives in organic solvents[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, 198: 21~37
- 17 王 华,陈辉,李雪梅,等. $V_{B_{12}}$ 功能及营养作用研究[J]. *中国食物与营养*, 2007, (2): 56~58
- 19 杜小燕,哈斯苏荣,朱蓓蕾,等. $V_{B_{12}}$ 的研究概况[J]. *中国动物保健*, 2003, (12): 38~39
- 19 罗 祎,郝常明. $V_{B_{12}}$ 的研究及其进展[J]. *中国食品添加剂*, 2002, (3): 15~18
- 20 Anca-Iulia Stoica, Mariana Peltea, George-Emil Baiules-

- cu, et al. Determination of cobalt in pharmaceutical products[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 36: 653~656
- 21 Li Hua-bin, Chen Feng, Jiang Yue. Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 891: 243~247
- 22 Adolfo Quesada-Chanto, Adriane C Schmid-Meyer, Adriana G Schroeder, et al. Comparison of methods for determination of vitamin B₁₂ in microbical material[J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(1): 75~77
- 23 Li Huabin, Chen Feng. Determination of vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparations by a highly sensitive fluorimetric method[J]. Fresenius J Anal Chem, 2000, 368: 836~838

Progress in Methods for Detecting Vitamin B₁₂ in Food

Zhou Xunlei, Zhang Zhijguo, Chu Qinghua, Sheng Qinghai, Zhang Jiacheng

(Department of Food, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

ABSTRACT Vitamin B₁₂ is important in vitamin B family, but very little is found in food. The recent methods of determining vitamin B₁₂ are reported. The advantages and the disadvantages of these methods are analyzed and the future development of the methods in food is discussed.

Key words vitamin B₁₂, cobalamin, the method of determination

食
业
新
闻

2008 海峡两岸食品论坛暨食品博览会将在厦门举行

随着全球经济一体化进程的不断加快,资源和生产要素也在加速流动和重组。海峡两岸食品经济在资金、技术、人才、劳动力、资源、市场、管理等经济要素方面存在着差异性和互补空间,蕴藏着比较经济利益。两岸食品产业如何顺应国际经济潮流,加强两岸食品经济要素的有效整合,开创两岸食品经济合作新局面,是当前海峡两岸食品界共同面临的机遇与挑战。“海峡两岸食品论坛”旨在通过高端对话与交流,探索海峡两岸食品产业合作机制,深化合作层面,通过资源和生产要素的有效整合,进一步发挥政策优势、区位优势、资源优势,实现优势互补、互利双赢,引领新一轮的食品经济发展潮流,推动海峡两岸食品产业发展战略的实施。

2008 海峡两岸食品论坛暨食品博览会将于 2008 年 12 月 26~28 日在厦门国际会展中心举行。展示范围:(1)食品类:饮料类、糖果饼干类、烘焙食品类、休闲食品类、罐头食品类、乳品类、蜜饯类等;(2)茶叶类:福建乌龙茶(安溪铁观音系列、大红袍、武夷岩茶、白牙奇兰茶等)、台湾乌龙茶、绿茶、红茶等;(3)烟酒类:烟草业、白酒、洋酒、啤酒、葡萄酒、黄酒果酒、保健药酒、;(4)民生食品类:大米类、面食类(包括方便面系列)、食用油类、肉制品类、冷冻食品类、海(水)产品类、调味品、蔬菜类(包括民生超市、冷冻脱水等蔬菜企业经销商等)、新鲜水果(包括地区性水果)、干果等;(5)保健品类:专业性功能食品、营养保健品(包括滋补品、保健饮品、保健医药品、鲜汁、药膳)等;(6)食品机械类:烹饪设备、烘烤设备、饮料(啤酒)机包装机、喷码热缩机、包装容器、包装材料、冷冻冷藏设备、肉类加工设备、食品添加剂、原辅料等;(7)现代农业与科技成果展示:现代生物工程技术、有机农业技术展示推广绿色食品、有机食品等。(8)台湾馆;(9)中华老字号。

联系电话:0592-2990022 15860747201;联系人:胡军彬;传真:0592-2990030 2990031;E-mail: baihuli2009@163.com;地址:厦门市湖滨西路 9 号亿力大厦 12C;邮编:361000;网站:www.haibow.com。

行
业
动
态

新疆首家果蔬营养面粉企业投产

新疆首家果蔬营养面粉企业——格瑞恩制粉科技有限公司 2008 年 11 月 18 日正式在乌鲁木齐投产。

果蔬营养面粉由新疆格瑞恩制粉科技有限公司生产,利用本地产优质小麦和蔬菜,经过 8 年时间终于研制成功“康维美”牌系列果蔬营养面粉,拥有日处理小麦 70t 的生产线,此技术 2005 年获得国家发明专利名号。

面粉是各种营养摄入的最好载体,“康维美”果蔬营养面粉将各种人体所需的营养成分有效融合更好吸收,并发挥其食疗功能。这种面粉有效地融合了蔬菜中的叶绿素等各种元素,其色彩丰富润泽,味道与相应的蔬菜一致清香、甘醇、温厚,富含人体必须的尼克酸叶酸,维生素、钙、铁、锌等营养元素,既有蔬菜的色彩,又有蔬菜的味道,还有蔬菜的营养。

果蔬营养面粉改变了原有面粉的营养成分,含有多种维生素、矿物质、蛋白质和矿水化合物,在保证消费者营养平衡的同时能满足各种人群的膳食要求,其中最主要是中老年人和儿童所需营养的摄入,以及各种慢性病能起到积极的食补和预防作用。