

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°C±1°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：液体试样维生素B₁₂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