DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251031003
引用格式: 曹荔, 李瑞菊, 廉红霞, 等. 食品中维生素 B_{12} 及其检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(6): 260–270.
CAO L, LI RJ, LIAN HX, *et al*. Research progress on vitamin B_{12} in food and its detection methods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(6): 260–270. (in Chinese with English abstract).

食品中维生素 B_{12} 及其检测方法的研究进展

曹　荔[1,2#], 李瑞菊[1#], 廉红霞[2], 李　霞[1], 杨赵伟[3], 刘凯珍[2], 张　超[1], 王峰恩[1*]

(1. 山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 济南　250100; 2. 河南农业大学动物科技学院, 郑州　450046; 3. 秦皇岛市农产品质量安全检验监测中心, 秦皇岛　066099)

摘　要: 维生素 B_{12} 作为人体必需的微量营养素, 在 DNA 合成、红细胞生成及神经系统功能维持中发挥关键作用, 其 4 种主要生物活性形式(氰钴胺素、甲基钴胺素、5'-脱氧腺苷钴胺素和羟钴胺素)中, 甲基钴胺素和腺苷钴胺素是体内发挥辅酶活性的主要形式。从食物中摄入足量的维生素 B_{12} 对人体健康至关重要, 而食品中维生素 B_{12} 的准确定量检测是进行维生素 B_{12} 功能研究、膳食营养评估及高质量功能性食品研发的技术基础。本文系统综述了食品中维生素 B_{12} 的重要性、检测方法的发展现状、含量及分布情况, 以及检测技术的难点。现有主流检测方法因依赖剧毒氰化物前处理、存在活性形态降解风险, 以及难以实现 5'-脱氧腺苷钴胺素和甲基钴胺素等活性形态的精准定量, 导致数据准确性不足和标准化缺失, 严重制约了维生素 B_{12} 形态特异性功能研究、膳食营养评估准确性提升及高质量功能性食品研发的深入发展。未来研究需聚焦检测技术的创新与标准化, 大力发展非氰化、绿色环保的前处理技术, 基于高效液相色谱-串联质谱法建立高灵敏度、高选择性的多形态分析手段, 推动检测流程的标准化, 建立统一、可比的数据体系, 为膳食评估、质量控制及功能性食品开发提供理论支撑与实践指导。

关键词: 维生素 B_{12}; 钴胺素; 检测方法; 素食

Research progress on vitamin B_{12} in food and its detection methods

CAO Li[1,2#], LI Rui-Ju[1#], LIAN Hong-Xia[2], LI Xia[1], YANG Zhao-Wei[3], LIU Kai-Zhen[2], ZHANG Chao[1], WANG Feng-En[1*]

(1. *Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products*, *Shandong Academy of Agricultural Sciences*, *Jinan* 250100, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology*, *Henan Agricultural University*, *Zhengzhou* 450046, *China*; 3. *Qinhuangdao Agriculture Product Quality Safety Inspection and Monitoring Center*, *Qinhuangdao* 066099, *China*)

收稿日期: 2025-10-31
基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100603); 中央引导地方资金项目(YDZX2024146); 河北省重点研发计划项目奶业振兴重大技术创新专项(19225502D); 山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所青年成长基金项目(2023CZ01)

#曹荔和李瑞菊为共同第一作者
第一作者: 曹荔(2002—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为反刍动物营养。E-mail: cl1809442973@163.com
李瑞菊(1972—), 女, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物检测技术研究。E-mail: liruiju-98@163.com
***通信作者:** 王峰恩(1983—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全与品质评价研究。E-mail: wfe8520382@163.com

ABSTRACT: Vitamin B_{12}, an essential micronutrient for humans, plays a crucial role in DNA synthesis, red blood cell formation and the maintenance of normal neurological function. Among its 4 kinds of major biologically active forms (cyanocobalamin, methylcobalamin, 5'-deoxyadenosylcobalamin and hydroxocobalamin), methylcobalamin and adenosylcobalamin are the primary coenzyme-active forms in the body. Adequate dietary intake of vitamin B_{12} is vital for human health, and accurate quantification of vitamin B_{12} in foods forms the methodological foundation and technical basis for studies on its physiological functions, dietary nutritional assessments and the development of high-quality functional foods. This review systematically summarized the significance of vitamin B_{12} in foods, the current progress in detection methodologies, its content and distribution in various foods and the technical challenges in measurement. Current mainstream analytical techniques relied on highly toxic cyanide-based pretreatments, pose risks of degradation to active forms, and struggle to achieve accurate quantification of coenzyme-active forms such as 5'-deoxyadenosylcobalamin and methylcobalamin. These limitations lead to insufficient data accuracy and lack of standardization, which significantly hinder advances in research on form-specific functions of vitamin B_{12}, improvements in dietary nutritional assessment accuracy and the development of high-quality functional foods. Future research needs to focused on the innovation and standardization of detection technologies, vigorously developing non-cyanide, green pretreatment methods and establishing highly sensitive and selective multi-form analysis method based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Promoting the standardization of detection workflows and establishing a unified, comparable data system will provide theoretical support and practical guidance for dietary evaluation, quality control and functional food development.

KEY WORDS: vitamin B_{12}; cobalamin; detection methods; vegetarian diet

0　引　言

维生素 B_{12}(钴胺素)是一种含钴的水溶性维生素, 作为人体必需的微量营养素, 在 DNA 合成、红细胞生成、神经系统功能维持等关键生理过程中发挥着不可替代的作用[1]。维生素 B_{12} 以 4 种主要生物活性形式存在: 氰钴胺素(cyanocobalamin, CNCbl)、甲基钴胺素(methylcobalamin, MeCbl)、5'-脱氧腺苷钴胺素(5'-deoxyadenosylcobalamin, AdoCbl)和羟钴胺素(hydroxocobalamin, OHCbl), 其中 MeCbl 和 AdoCbl 是体内具有辅酶活性的主要形式[2]。由于人类缺乏合成维生素 B_{12} 的能力, 必须通过饮食获取, 而维生素 B_{12} 几乎只存在于动物源食品中, 这使得素食人群面临较高的缺乏风险[3]。

维生素 B_{12} 检测技术的发展经历了从传统微生物法到现代色谱-质谱技术的演变[4]。早期依赖微生物生长测定的方法虽然成本低廉, 但存在耗时长(48~72 h)、可能误检非活性类似物等固有缺陷[5]。随着分析技术的进步, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)逐渐成为主流方法, 而近年来质谱技术的应用更是将检测灵敏度和特异性提升到了新的水平[6–7]。

本文系统综述了食品中维生素 B_{12} 的重要性、检测方法的发展现状、含量及分布情况, 以及检测技术的难点, 并探讨当前面临的挑战与未来发展方向, 旨在为食品营养分析、质量控制和功能性食品开发提供理论依据和技术支持。

1　维生素 B_{12} 的重要性

1.1　化学结构与活性形式

维生素 B_{12} 的分子结构复杂, 其核心是一个由 4 个吡咯环组成的咕啉环, 中心配位着一个三价钴离子, 形成了罕见的有机金属化合物[8]。这种结构使其呈现独特的深红色结晶形态, 易溶于水却难溶于有机溶剂。如图 1 所示, 4 种主要钴胺素变体的区别在于 β-轴向配体(R)的不同: CNCbl 含氰基(CN), MeCbl 含甲基(Me), AdoCbl 含 5'-脱氧腺苷基(Ado), OHCbl 含羟基(OH)[2]。

CNCbl 本身缺乏生物活性, 但它作为维生素 B_{12} 最稳定的形式, 被广泛应用于食品强化和药物补充剂中[1,4,6]。在生物体内, CNCbl 通过黄素蛋白还原酶介导的逐步还原反应(从 Co^{3+} 还原为 Co^{2+}, 再至 Co^{+})被酶激活, 最终形成具有高度反应活性的超亲核物质, 以 MeCbl 或 AdoCbl 的形式发挥其生物学功能[7–8]。

1.2　生理功能与缺乏症临床表现

维生素 B_{12} 作为辅酶参与多种关键生化反应。MeCbl 作为甲硫氨酸合成酶的辅因子, 催化同型半胱氨酸甲基化生成甲硫氨酸, 该反应对维持一碳代谢和通过 DNA 甲基化实现表观遗传调控至关重要[9–10]。AdoCbl 则通过核糖核苷酸还原酶参与脱氧核苷酸的合成, 直接影响造血干细胞和肠道上皮细胞的增殖, 并维护基因组的稳定性[11–12]。

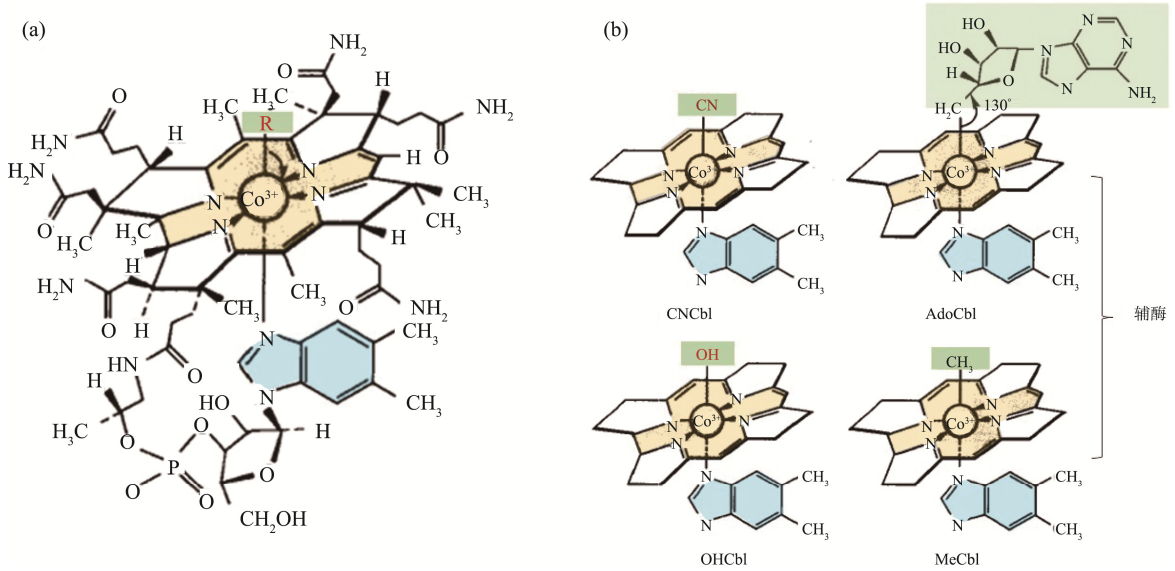


图 1 维生素 B_{12}(钴胺素)的化学结构(a)及 4 种活性变体的结构简式(b)

Fig.1 Chemical structure (a) of vitamin B_{12} (cobalamin) and structural formulas (b) of its 4 kinds of active variants

此外，AdoCbl 通过甲基丙二酰-CoA 变位酶介导分子内重排反应，这一过程对髓鞘脂质的生物合成、轴突完整性和神经元传导的维持至关重要，同时参与神经递质代谢途径的调控[13]。

这些生理功能在人体代谢中发挥着不可或缺的作用，因此维生素 B_{12} 缺乏可导致多种健康紊乱[4]。在代谢方面，缺乏会引发高同型半胱氨酸血症——这是心血管疾病的独立危险因素[1,13–14]。在血液系统方面，缺乏会诱发巨幼细胞性贫血，其特征是骨髓造血功能受损和全血细胞减少[14–16]。在神经系统方面，维生素 B_{12} 缺乏会导致进行性神经病变，表现为感觉异常和运动功能障碍，严重时可发展为亚急性联合变性[17–19]。

1.3 膳食摄入与缺乏症风险群体

维生素 B_{12} 的生物合成基本上仅限于一些原核生物，因为只有这些微生物拥有该过程所需的酶群。虽然，人体肠道细菌也能够生物合成一部分维生素 B_{12}，但远远不能达到人体所需的水平[9,20]。因此，人体主要通过膳食摄入补充和维持体内维生素 B_{12} 的水平。膳食中的维生素 B_{12} 通常与食物蛋白质结合，其吸收始于胃内环境，依赖胃酸和胃蛋白酶将其从食物基质中释放出来[20]。释放后的维生素 B_{12} 立即与来自唾液和食管腺的糖蛋白——嗜铬蛋白结合，这种结合可保护其免受胃内酸水解[21]。维生素 B_{12}-嗜铬蛋白复合物进入十二指肠后，被胰蛋白酶降解，再次释放出的维生素 B_{12} 与胃壁细胞分泌的内因子结合[15,21]。该复合物最终在回肠末端通过受体介导的内存作用被吸收，这是一个主动运输过程，但其吸收效率具有剂量依赖性，口服 0.1 μg 时吸收率可达 80%，而剂量升至 500 μg 时，吸收率降至约 1%[6]。此外，约有 1%~2%的维生素 B_{12} 可通过被动扩散方式被吸收，这一途径在高剂量口服补充时显得尤为重要[2]。

维生素 B_{12} 的膳食来源具有明显的动物性特征，其主要存在于动物源性食品中。其中肝脏的含量尤为突出，可达 20~60 μg/100 g，其次是肉类，含量在 0.7~3.0 μg/100 g 之间[22–25]。某些水产品也是维生素 B_{12} 的极佳来源，例如牡蛎含量超过 42 μg/100 g，扇贝更是高达 78 μg/100 g，鲑鱼也可提供超过 2 mg/100 g[24,26]。与此形成鲜明对比的是，天然植物性食物通常不含或仅含微量维生素 B_{12}，小麦、大米、玉米和土豆等主食中完全检测不到其存在[20,27]。

素食主义者由于完全排除动物性食物来源，面临较高的维生素 B_{12} 缺乏风险[3,28]。在素食者中，62%的孕妇、25%~86%的儿童、21%~41%的青少年以及 11%~91%的老年人均表现出相应的症状[1]。严格素食者的维生素 B_{12} 患病率更高，而且越早开始素食患病率就越高[3,28]。与此同时，健康状况也可能损害或阻止维生素的吸收。例如，老年人的消化系统疾病会显著降低 B_{12} 的吸收率，这主要与萎缩性胃炎导致的内因子分泌不足有关[9,20]。

针对高风险人群，特别是严格素食者、老年人及吸收障碍患者，应定期监测血清中钴胺素水平，并通过强化食品或补充剂实行个性化干预，以确保满足每日所需[3,16]。当前市售补充剂主要采用稳定性较高的 CNCbl 或 MeCbl 等形式，其以游离态存在，生物利用度显著高于天然食物中与蛋白质的结合态[6]。在众多产品类型中，钴胺素的含量差异较大，如多维元素片(625~630 mg/kg)、MeCbl 浓缩粉约 0.8% *w*/*w*、及婴幼儿的配方食品(9.5~12 ng/g)[29–31]。

2 食品中维生素 B_{12} 的含量和分布

维生素 B_{12} 在自然界中的分布极不均衡，其含量与存在形式深受生物合成途径、食物链传递及加工工艺的影响。

系统了解不同类别食品中维生素 B_{12} 的含量与分布规律, 对于指导膳食营养、开发强化食品以及进行风险评估具有至关重要的意义。

2.1　动物源食品

动物源食品是天然维生素 B_{12} 最可靠且主要的膳食来源, 其含量在不同物种及产品类型间表现出显著的差异。近 20 年的文献资料(表 1)显示, 在肉类中, 不同物种的维生素 B_{12} 含量有所不同, 反刍动物如牛肉和小牛肉的含量为 0.36~4.43 μg/100 g, 羊肉或羔羊肉为 0.2~4.02 μg/100 g, 而单胃动物如猪肉的含量为 0.13~3.7 μg/100g, 禽肉如鸡肉和火鸡肉的含量为 0.33~3.29 μg/100 g。相比之下, 内脏器官作为维生素 B_{12} 的主要储存部位[4], 其含量远超肌肉组织, 且不同物种间存在较大差异。牛肝和小牛肝的含量较高, 可达 53.5~111.5 μg/100 g, 而猪肝和鸡肝的含量分别约为 40 μg/100 g 和 20 μg/100 g。羊肾的含量较高, 可达 52.6~110.4 μg/100 g, 而猪肾和牛肾的含量分别约为 20 μg/100 g 和 4.8~7.1 μg/100 g。

在奶及奶制品中, 早期测得的数据显示(表 1), 牛奶的含量为 0.2~0.7 μg/100 g, 绵羊奶、水牛奶和马奶的含量约为 0.3 μg/100 g, 山羊奶和人奶的含量较低, 约为 0.07 μg/100 g 和 0.05 μg/100 g。初级加工品如高温灭菌乳、脱脂奶、奶油、酪乳的含量分别约为 0.38、0.3、0.3、0.095~0.23 μg/100 g, 这说明了奶及奶制品中维生素 B_{12} 含量的稳定性, 同时也对维生素 B_{12} 与食品蛋白质结合提出了质疑。然而, 近期的数据显示[2]牛乳的含量可达 1.915~4.533 μg/100 g, 山羊奶可达 3.054 μg/100 g, 脱脂乳可达 0.915~3.786 μg/100 g, 这些异常高的数据也值得本文谨慎怀疑和进一步探讨。

禽蛋也是维生素 B_{12} 的一个重要来源, 如鸡蛋黄中的含量约为 2.0 μg/100 g, 而鸡蛋白中仅含有约 0.1 μg/100 g (表 1)。然而, 目前的文献数据较少, 有待更多的测定数据和系统研究。

水产品由于其种类繁多且复杂, 其维生素 B_{12} 含量呈现显著多样性, 部分种类表现出极高的富集特性。有数据表明[32], 鱼肉中维生素 B_{12} 含量与陆地动物肉中相当, 如鲱鱼中约为 8.5 μg/100 g, 鳗鱼中约为 1 μg/100 g。然而, 水产品中维生素 B_{12} 的含量受物种、生长环境、季节和捕捞时期的影响较大, 个体间含量可能存在极大差异。也有研究[26,33]发现某些水产品中维生素 B_{12} 含量尤为突出, 如鲑鱼中约为 2000 μg/100 g, 三文鱼中为 2000~2450 μg/100 g, 草鱼中为 1740~2230 μg/100 g, 牡蛎为 42100 μg/100 g, 扇贝为 78300 μg/100 g。这种高含量可能与水生生物的生态特性密切相关, 滤食性生物(如牡蛎、扇贝)通过滤食水体中的微生物和有机颗粒, 间接富集了由微生物合成的维生素 B_{12}, 而鱼类(如鲑鱼、三文鱼、草鱼)则通过食物链传递积累。到目前为止, 仍缺乏足够的数据来验证上述结论的准确性, 因此, 在将水产品作为可靠的维生素 B_{12} 来源时, 需结合具体物种和产地数据评估其营养贡献, 并对现有数据持相对审慎的态度。

2.2　植物源食品

绝大多数天然植物性食品不含或仅含微量维生素 B_{12}, 因为植物本身缺乏合成该维生素的酶系统。研究表明, 在小麦、水稻、玉米和土豆等主要作物中几乎检测不到维生素 B_{12} 的存在[1,20,34], 苹果汁中也未检出维生素 B_{12}[26]。这一共识与维生素 B_{12} 几乎完全来源于微生物合成的生物学特性相符。

然而, 文献资料(表 1)也呈现了一些看似违背常识的数据。例如, 猕猴桃、番茄浆和沙棘中均检出了较高含量的维生素 B_{12}[34–35]。这些含量的检出可能源于植物表面或内部共生的特定微生物污染或共生关系, 也可能是检测方法的差异造成的。这些数值若属实, 将远高于许多动物源食品, 对素食者的营养来源认知可能产生重要影响。对于这些异常高的数据, 本文需持非常审慎的态度。因此, 在将这些植物性食物视为可靠维生素 B_{12} 来源之前, 需要更多严谨的研究来验证其维生素 B_{12} 的存在形式、生物利用度以及含量的稳定性。

2.3　加工食品

加工制品中维生素 B_{12} 的最终含量深受加工工艺的显著影响, 其稳定性与生物利用度成为关键考量。食品加工过程, 特别是热加工和发酵, 会改变维生素 B_{12} 的含量。如表 1 所示, 牛肉干通过自然风干, 其水分大量散失导致维生素 B_{12} 的含量远高于生牛肉, 为 1.117~2.608 μg/100 g。香肠、腊肠和腊肉中的含量与肉类相当, 约为 0.3~2.20 μg/100 g, 而火腿和培根则明显下降, 约为 0.09~0.69 μg/100 g。在乳制品加工中, 巴氏杀菌造成的维生素 B_{12} 损失通常较小, 如长时间加热(如高温灭菌)会导致约 30%的损失[4]。还有研究发现, 微波加热使牛肉和牛奶中维生素 B_{12} 损失达 40%[38], 但真空包装烹饪可完全保留活性[39]。对于强化食品(如早餐谷物、婴幼儿配方食品), 人工添加的 CNCbl 或 MeCbl 使其含量可控且稳定, 一般到达与肉类食品相当或略高的水平, 约为 0.93~2.72 μg/100 g。这类产品中维生素 B_{12} 以游离形式存在, 生物利用度显著高于天然食物中的结合态, 成为婴儿、老年人、素食人群及吸收障碍患者的可靠营养来源[1]。

3　食品中维生素 B_{12} 检测方法的发展现状

维生素 B_{12} 的准确检测对于评估食品营养价值及保障特定人群(如素食者和老年人)健康具有重要意义[3]。其检测方法的发展经历了从依赖生物活性的传统微生物法, 到基于物化分离的色谱技术, 再到高灵敏度、高特异性的质谱方法, 并逐渐向快速、现场化检测方向演进。早期方法如微生物法虽成本低但耗时且特异性差; 色谱法大幅提升了分离能力和准确性; 质谱技术进一步实现了痕量检测与多形态分析; 而快速方法则侧重于现场应用与高通量筛查。

表 1 不同食品中维生素 B_{12} 的含量(参考近 20 年内文献数据)

Table 1 Content of vitamin B_{12} in different food products (with reference to literature data from the past 20 years)

基质	含量/(μg/100 g)	检测方法	文献来源	基质	含量/(μg/100 g)	检测方法	文献来源
生牛乳	1.915~4.533	UPLC-MS/MS	[2]	苹果汁	ND	HPLC-UV/DAD	[26]
脱脂乳	0.915~3.786			强化果汁	142±7		
脱脂乳粉	1.777			烟熏三文鱼	2000±5		
全脂山羊乳	3.054			新鲜三文鱼	2450±6		
羔羊肉	0.20~4.02	NG	[20]	熏鲑鱼	2000±5		
绵羊肉	0.42~2.80			太平洋牡蛎	42100±2		
绵羊肾	52.6~110.4			大扇贝	78300±4		
山羊肉	1.09~1.17			成人奶粉	1.55~1.76	HPLC-MS	[30]
小牛肉	0.52~3.00			婴儿配方奶粉	0.93~1.42		
牛肉	0.36~4.43			人乳	0.05	NG	[32]
牛肝	53.5~111.5			牛乳	0.4~0.5		
牛肾	4.8~7.1			鸡蛋黄	2		
生牛肉	0.7~1.5	HPLC-MS	[23]	鸡蛋白	0.1		
熟牛肉				牛肉	1.0~3.0		
猪肉	0.13~3.7	NG	[24]	猪肉	0.8		
火鸡肉	0.41~3.29			小牛肝	60		
鸡肉	0.33~1.73			猪肝	40		
香肠或腊肠	0.30~1.54			鸡肝	20		
火腿	0.09~0.69			猪肾	20		
培根	0.362~0.620			血肠	50		
腊肉	0.41~2.20			鲱鱼	8.5		
牛肉干	1.117~2.608			鳗鱼	1		
牛奶	0.2~0.7			草鱼	1740~2230	HPLC-DAD	[33]
绵羊奶	0.3			玉米粉	ND	HPLC-MS/MS	[34]
山羊奶	0.07			绿心猕猴桃	5.4±0.3		
水牛奶	0.3			黄心猕猴桃	19±1		
马奶	0.3			番茄浆	16±2		
人奶	0.05			沙棘	<37.01	HPLC-UV/DAD	[35]
脱脂奶	0.3			燕麦提取物	23.10~25.83		
高温灭菌奶	0.38			小牛肝	65.59		
酪乳	0.095~0.230			饮料	0.0531~3.4800	HPLC-DAD	[36]
奶油	0.3			蛋白型固体饮料	1.067~3.000	UPLC-MS/MS	[37]
酸奶	0.17~0.43						
奶酪	0.38~3.10						

注: NG. 未给出; ND. 未检出。高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS); 高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS); 高效液相色谱法-二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-diode array detector, HPLC-DAD); 超高效液相色谱-串联质谱法(ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS); 高效液相色谱法-紫外/二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-ultraviolet/diode array detector, HPLC-UV/DAD)。

3.1　传统微生物法

传统微生物法作为维生素 B_{12} 检测的经典方法，其原理是利用特定微生物(如莱士曼氏乳酸杆菌，即德尔布吕氏乳杆菌)的生长对维生素 B_{12} 的依赖性，通过测定微生物在含维生素 B_{12} 培养基中的生长速率或浊度变化来间接定量维生素 B_{12} 含量[40]。

尽管细叶绿芽孢杆菌、大肠杆菌等微生物也曾被尝试，但官方 AOAC 国际官方分析协作协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)参考方法[41−42]主要选用德尔布吕氏乳杆菌，原因在于其他菌种对不同钴胺素形式的灵敏度与特异性较低，或存在反应耗时较长等缺点[5]。该方法具备检测灵敏度高(可达 pg/mL 级别)、设备简单、成本较低的优点，但亦存在显著局限性，包括分析周期长(通常需 48~72 h)、易受无生物活性的结构类似物干扰导致假阳性，以及重现性较差(相对标准偏差常高于 15%)[1]。为提升检测效率，研究者不断进行技术优化，例如黄进丽等[43]采用 60%甘油水冻存菌种延长菌液活性保存期，韩冀等[44]发展微孔板法缩短孵育时间并减少污染风险，李丰等[45]则通过直接提取策略实现更低的检出限与良好的回收率。

尽管如此，由于微生物法整体仍被视为一种耗时、通量有限且结果不确定性较高的传统方法[27]，其在现代检测体系中的应用逐渐被色谱法与质谱法等物理化学方法所替代，目前多用于初筛或资源受限场景。在标准层面，我国 GB 5413.14—2010《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B_{12} 的测定》采用微生物法测定婴幼儿食品和乳品中的维生素 B_{12}，而国际上的 AOAC 986.23 亦将其作为乳基婴幼儿配方粉中维生素 B_{12} 测定的参考方法。

3.2　高效液相色谱法

HPLC 作为维生素 B_{12} 检测的主流技术，凭借高效分离与紫外、二极管阵列或荧光检测联用，实现了对维生素 B_{12} 及其类似物的高选择性定量。如图 2 所示，其核心原理是利用固定相与流动相之间的吸附分配差异对目标物进行分离，再通过特征紫外吸收(361 nm)或经衍生化后的 FLD 信号进行检测。该方法因其在灵敏度、选择性和通用性方面的良好表现，被广泛用于复杂食品基质中维生素 B_{12} 的测定[34]。

HPLC-UV/DAD 法[25,29,31,35]不仅操作简便，还能提供光谱信息辅助定性确认，但该方法灵敏度有限且易受基质干扰，常需结合复杂的样品前处理(如将各种钴胺素氰化转化为 CNCbl)。亲水相互作用色谱法(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)的引入有效改善了维生素 B_{12} 极性类似物的分离，并避免了剧毒氰化物的使用[26]。UPLC 利用小粒径填料(<2 μm)进一步提升了分析速度与分辨率，如励炯等[46]结合免疫亲和柱净化，实现了奶粉中维生素 B_{12} 的高灵敏检测(检出限 2 μg/kg)与良好回收率。HPLC-FLD 法通过衍生化(如生成 α-核糖唑)显著提升灵敏度，例如刘春丽等[36]建立的免疫亲和柱结合 HPLC-FLD 法检出限达 0.06 ng/g。

值得注意的是，免疫亲和柱的普及为复杂基质中维生素 B_{12} 的选择性提取和纯化提供了强大工具，显著提高了方法的选择性与准确性[25,31]。尽管 HPLC 法需依赖严格的样品前处理以消除基质干扰，但其良好的准确性和稳定性使其逐渐成为测定维生素 B_{12} 的主流方法[34]。在标准层面，国际 AOAC 方法(如 2014.02 和 2011.10)与 GB 5009.217—2008《保健食品中维生素 B_{12} 的测定》均将 HPLC(主要为 HPLC-UV)采纳为测定食品中维生素 B_{12} 的基准方法。

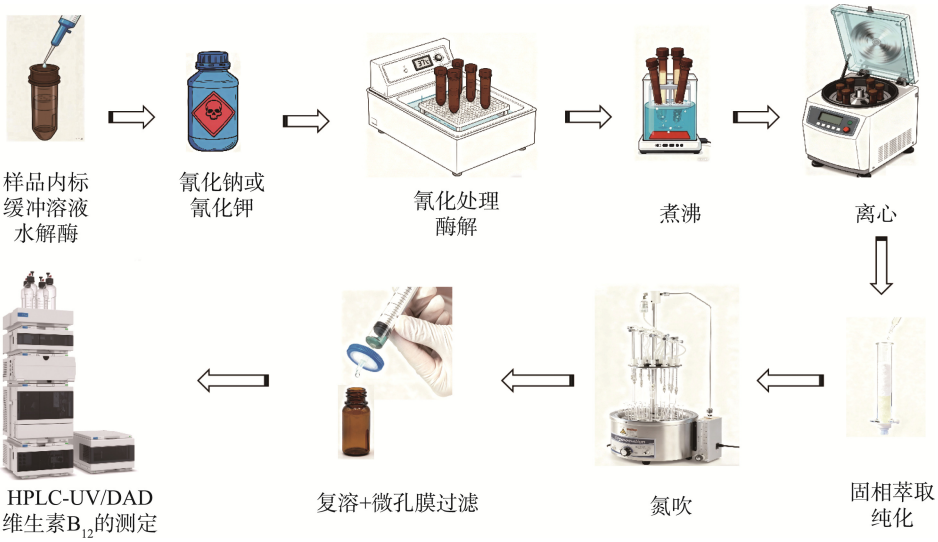


图 2　食品中维生素 B_{12} 的主流检测方法的示意图

Fig.2　Schematic diagram of mainstream detection methods for vitamin B_{12} in food

3.3 质谱法和串联质谱法的应用

质谱法和串联质谱法的应用将其高灵敏度、高特异性与 HPLC 的分离能力相结合, 实现了对食品基质中痕量维生素 B_{12} 及其多种活性形式的精准分析与定量, 逐渐成为痕量分析和多形态检测的黄金标准[30]。其基本原理是待测物经色谱分离后, 在离子源(如电喷雾离子源)中离子化, 产生的母离子在质量分析器中进一步碎裂生成特征子离子, 通过多反应监测模式显著提高信噪比并有效排除基质干扰。

早期研究如 LUO 等[30]采用 HPLC-MS/MS 成功测定奶粉中维生素 B_{12}, 提高了检测灵敏度与可靠性。GENTILI 等[34]进一步开发了可同时测定多种亲水维生素(包括维生素 B_{12} 及 5 种维生素 B_6 形式)的 HPLC-MS/MS 方法, 凸显了其在复杂基质中实现多组分痕量分析的独特优势。CZERWONKA 等[23]利用 HPLC-MS 技术, 成功区分并定量了牛肉中维生素 B_{12} 的 3 种生物活性形式 AdoCbl、MeCbl 和 CNCbl, 发现 AdoCbl 为牛肉中的主要存在形式(占比超过 68%), 体现了 HPLC-MS 在多形态分析方面的强大能力。

串联质谱的显著优势包括极高的灵敏度, 如 WANG 等[2]采用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-Q exactive-orbitrap-mass spectrometry, UPLC-QE-Orbitrap-MS)定量限达 0.20 μg/kg, 以及良好的重现性和准确性。而同位素稀释内标法(如 ^{13}C 标记的 CNCbl)的有效应用, 可校正前处理过程中的分析物损失, 也极大提高了检测的准确度。鉴于 HPLC-MS/MS 在灵敏度和准确性方面的优势, 已被 GB 5009.285—2022《食品安全国家标准 食品中维生素 B_{12} 的测定》采纳为测定食品中维生素 B_{12} 的权威方法, 标志着该技术已成为满足当前高标准检测需求的核心工具。

3.4 快速检测方法

快速检测方法作为维生素 B_{12} 检测技术的重要发展方向, 侧重于现场快速筛查与高通量分析, 其核心原理主要基于免疫识别、生物传感及纳米材料探针等特异性识别与信号放大技术实现快速定量。该类方法旨在弥补传统方法前处理复杂、耗时较长的不足[1]。

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是其中应用较早的技术, 李江等[38]将其成功用于婴幼儿奶粉中维生素 B_{12} 的检测, 具备操作简便、通量高的优点, 但存在抗体成本较高、易受食品基质干扰的局限。光学生物传感器免疫分析法利用维生素 B_{12} 结合蛋白对钴胺素的特异性识别, 通过光学信号转换实现检测, 灵敏度约为 0.1~4.0 ng/mL, 虽适用于强化食品和药品的快速分析, 但其灵敏度相对较低, 且与微生物法的结果一致性仍有待进一步提高[47–48]。放射性蛋白结合方法曾用于血液和组织样本, 基于 ^{57}Co 标记钴胺素与样品中维生素 B_{12} 竞争结合内因子等特异性蛋白, 虽经氰化处理可将不同形式转化为 CNCbl 统一检测, 且与微生物法在某些食品中结果一致, 但因放射性物料的使用限制, 其在食品分析中的应用较为有限[5]。近年来, 纳米材料探针技术展现出显著创新潜力, 如李一鸣等[49]开发的抗坏血酸包裹铜纳米簇 FLD 探针, 通过“一锅法”合成, 检出限达 0.07 μmol/L, 兼具良好生物相容性与潜在成像功能, 但该技术目前仍存在线性范围分段、实际样品验证不足等问题。总体而言, 快速检测方法在重现性与定量精度上尚不及色谱法与质谱法等标准方法, 但其在简化操作、缩短时间方面的优势, 为现场筛查与即时检测提供了可行路径, 未来需在稳定性、抗干扰能力和成本控制方面持续优化[50]。

4 食品中维生素 B_{12} 检测技术的难点

根据现有文献数据(表 1)分析, 目前关于食品中维生素 B_{12} 含量的系统性研究仍较为匮乏, 且部分数据存在显著异常或争议性, 反映出该领域在检测数据的完整性与一致性方面存在明显不足。因此, 建立准确、稳定、标准化的检测方法体系, 已成为系统阐明不同食品基质中维生素 B_{12} 含量分布特征的关键前提。当前, 维生素 B_{12} 的检测工作主要面临以下几方面技术挑战。

4.1 化学稳定性较差

维生素 B_{12} 的稳定性受多种环境因素影响, 其中光、热和 pH 是最关键的影响因素[51–53]。在光照条件下, 所有钴胺素变体均表现出不同程度的敏感性, 尤其是 MeCbl 和 AdoCbl, 它们在紫外光照射下可在数秒内降解为 OHCbl 或进一步氧化产物[54]。CNCbl 在光照下会转化为 OHCbl(中性或碱性条件)或水合钴胺素(H_2OCbl^+, 酸性条件), 而 OHCbl 则会不可逆地降解为未知的咕啉环氧化产物[55–56]。光解速率受 pH 显著调控, 例如 CNCbl 在 pH 1 时的光解速率比 pH 8.5 高 33 倍, 质子化形式更易发生光解反应[53]。此外, 核黄素作为光敏剂可加速 CNCbl 的光解, 在 pH 7.4 时使 OHCbl 光降解速率提高 3 倍[54–57]。

热稳定性方面, 固态 CNCbl 在 100 ℃下可保持数小时稳定[5,58], 但其水溶液在 60 ℃储存 48 h 会导致 8.6%的降解[51]。温度升高显著加速降解动力学, pH 2 时 CNCbl 半衰期从 4 ℃的 63 d 缩短至 37 ℃的 8 d, 而 pH 6 时半衰期从 231 d 降至 116 d[59]。AdoCbl 的热解机制具有温度依赖性, 85 ℃时半衰期仅 15 h, 而 30 ℃时延长至 690 d[60]。MeCbl 在 100 ℃加热 20 min 仍能保持结构完整, 但在光照协同下会快速转化为 OHCbl[5,61]。pH 对稳定性的影响呈“U”型曲线, 所有钴胺素在强酸(pH<2)或强碱(pH>9)环境中均不稳定[5,58,62]。CNCbl 在 pH 4~7 范围内最稳定[63], OHCbl 和 MeCbl 在 pH 3 和 9 的溶液中 24 h 降解率分别达 20%~24%和 64%~78%[52], 而 AdoCbl 在 pH 7.5 时稳定性最佳。水解反应是 pH 影响的主要机制, 极端 pH 会导致酰胺侧

链水解(生成单至七羧酸衍生物)或核苷酸磷酸键断裂[64–67]。

氧化还原环境同样影响稳定性, 抗坏血酸等还原剂通过将 Co^{3+}还原为 Co^{2+}(生成伪维生素 pseudo-B_{12})并进一步氧化为 OHCbl, 在 25 ℃下 24 h 内可导致 65%的 CNCbl 降解[55]。铁盐和卤化物(如 $FeCl_3$、KI)可通过竞争性氧化作用稳定 CNCbl[59,68–69], 而山梨醇通过降低水分活度使 MeCbl 光降解率从 39%降至 1%[65]。值得注意的是, 维生素 B_{12} 与硫胺素、烟酰胺等 B 族维生素共存时会加速降解, 例如含硫胺素和烟酸的溶液中 MeCbl 降解最显著[52,70]。

4.2　剧毒物质的使用

目前, 食品中维生素 B_{12} 的主流检测方法(如 AOAC 官方方法及我国 GB 5009.285—2022 等标准方法)在前处理阶段普遍依赖剧毒氰化物(如氰化钾或氰化钠), 将各类钴胺素转化为 CNCbl, 再经煮沸实现无毒化处理, 最终统一检测 CNCbl 含量以表征维生素 B_{12} 总量。该方法存在 3 方面突出问题: (1)违背绿色化学原则, 对实验人员构成显著安全风险; (2)氰化物作为严格管控试剂, 其获取困难极大制约了方法的实际可操作性[5]; (3)高温处理过程易导致游离钴胺素降解或转化为 OHCbl 等副产物, 引入测定误差。为解决上述问题, 近年来研究重点聚焦于开发非氰化前处理策略。

LI 等[10]通过酸性水解与去磷酸化步骤释放 α-核糖唑(维生素 B_{12} 的核苷部分), 再使用 HILIC 检测钴胺素衍生的 α-核糖唑, 成功现了婴幼儿配方奶粉中维生素 B_{12} 的定量检测。李樑等[71]通过酶解、免疫亲和柱纯化及微波消解将钴胺素转化为无机钴离子, 再使用电感耦合等离子体质谱法测定, 间接推算维生素 B_{12} 总量, 实现了婴幼儿配方奶粉中维生素 B_{12} 的定量检测。

4.3　钴胺素变体的分别检测

鉴于 AdoCbl 和 MeCbl 在脱离蛋白质结合态转化为游离形态后化学稳定性显著降低, 在光照条件下极易发生降解, 而实验室环境中实现全程严格避光操作存在显著困难, 该技术瓶颈严重制约了检测结果的准确度与重现性。因此, 现行食品中维生素 B_{12} 的主流检测方法(如 AOAC 官方方法及我国 GB 5009.285—2022 标准)普遍采用氰化衍生策略, 将各类钴胺素统一转化为性质稳定的 CNCbl 后进行总量测定。然而, AdoCbl 和 MeCbl 作为体内具有关键生物学活性的存在形式, 在代谢通路中作为辅酶直接参与多种生化反应, 当前以总量检测为导向的分析技术无法实现其特异性定量, 严重制约了在医学机制研究、营养学评估及食品品质评价等领域的深入探索。因此, 发展能够实现多种钴胺素变体精准测定的分析技术已成为亟待突破的关键需求。

CZERWONKA 等[23]基于优化的样品前处理与提取技术, 采用 HPLC-MS 成功实现了对牛肉中 AdoCbl、MeCbl 和 CNCbl 的分别定量, 并确认 AdoCbl 为其主要存在形式, 标志着在维生素 B_{12} 多形态分析技术方面取得了重要进展。FAN 等[72]也尝试建立了一种 HPLC-MS/MS 方法来同时检测 AdoCbl、MeCbl 和 OHCbl, 有效排除了伪维生素 B_{12} 的假阳性干扰, 基本实现了发酵食品中维生素 B_{12} 的多形态分析。

4.4　检测方法适用范围与局限性

不同维生素 B_{12} 检测方法在基质适配性、灵敏度及形态分离能力方面存在明显差异, 因此准确明确各方法的适用范围对于建立标准化检测体系至关重要。微生物法因其灵敏度中等、操作简便, 适用于乳制品、婴幼儿配方粉等以水溶性、易提取基质为主的样品。但其对结构类似物缺乏区分能力, 易受食品基质中拟维生素 B_{12} 或其他类似物干扰, 因此不适用于高脂食品、含较多杂质的植物基食品及海藻类样品。HPLC-UV/DAD 方法适用于多数普通食品, 但在复杂基质中容易受到色素、多酚、脂类等干扰, 同时其分离能力有限, 难以实现维生素 B_{12} 多活性形态的有效区分, 且对痕量样品的检测能力不足。相比之下, 液相色谱 - 串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)具有高灵敏度、强抗干扰能力以及可实现 CNCbl、MeCbl、AdoCbl、OHCbl 多形态联合定量的优势, 是目前最适用于痕量样品、复杂食品基质以及需要形态分析场景的检测技术, 特别适合植物基食品、海藻类样品、加工食品及营养强化食品的检测。快速检测方法(如免疫法、比色法等)操作简单、适合现场使用, 可用于大批量初筛或监管抽检, 但受基质干扰大、定量能力弱, 不适用于科研级别或需要形态分辨的精确检测。

不同来源食品中维生素 B_{12} 的检测在样品前处理策略、方法选择及结果可靠性方面也存在显著差异。动物源食品通常蛋白质和脂类含量较高, 维生素 B_{12} 多以结合态存在, 因此需通过蛋白酶水解或适度热处理释放结合态钴胺素, 并结合脱脂步骤以减少脂质干扰; 若处理不足, 易导致回收率偏低或形态测定偏差。植物基食品中天然维生素 B_{12} 含量较低, 且伴随多酚、膳食纤维和色素等强干扰基质, 需采用复合酶解或增强型固相萃取以提高纯化效率, 否则可能产生色谱干扰和质谱抑制。水产品样品富含盐分和金属离子, 易加速 MeCbl 和 AdoCbl 发生氧化或分解, 因此需加入抗氧化剂并全程避光, 同时注意去除高盐组分以避免影响萃取柱和色谱分离。强化食品中 B_{12} 多以稳定的 CNCbl 形式存在, 但大量添加剂(糖类、矿物质、稳定剂)易影响固相萃取洗脱效率, 若未优化纯化条件, 可能引起回收率偏低。

综上, 各方法在适用基质和含量范围上差异显著, 微生物法适用于水溶性和中等含量食品, HPLC 适用于中等复杂度和常规含量样品, LC-MS/MS 适用于低含量和复杂基质食品, 而快速检测方法则更适合初筛和现场监测。

5 结束语

食品中维生素 B_{12} 检测技术经历了从传统微生物法到现代仪器分析法的显著演进，形成了以 HPLC 及其与质谱法联用技术为主流的分析体系。微生物法虽具生物活性相关性且成本较低，但因其耗时冗长、易受类似物干扰及重现性差等固有局限，逐渐被以色谱-质谱法为核心的现代分析方法所替代。HPLC-MS/MS 等技术凭借高灵敏度与高特异性，成为精准定量、痕量分析与活性形态鉴定的黄金标准。而免疫亲和柱的开发使用，以及前处理技术的不断完善，有效提升了复杂食品基质中维生素 B_{12} 的纯化效率与检测准确性。在应用基础方面，研究已明确维生素 B_{12} 在动物源性食品中含量丰富，尤其是内脏器官和水产品，而其在不同食品中的具体存在形态、分布规律及加工稳定性也逐步被揭示，为膳食营养评估与食品质量控制奠定了坚实基础。

当前领域仍面临一系列关键挑战。(1)主流方法依赖剧毒氰化物进行前处理，存在安全风险且可能因高温衍生导致活性形态降解，影响结果准确性。(2)对具有直接生理活性的 AdoCbl 和 MeCbl 的形态特异性检测仍存在技术瓶颈，其化学不稳定性严重制约了其精准定量。(3)缺乏多种钴胺素的独立内标物，以及在不同基质中有效的校正策略，成为制约多形态检测和评估基质效应的主要因素。(4)现有文献数据具有显著的碎片化特征，且矛盾突出，反映出检测标准不统一、结果可比性差的现状。

针对现有问题，未来研究应聚焦于以下方向。(1)发展绿色、低毒性前处理方法，重点探索酶法、固相萃取、HILIC 等替代策略，在不破坏活性形态的前提下实现高回收率萃取。(2)加强活性形态的稳定性机制研究，明确如光、热、pH 环境等因素对不同食品基质中 AdoCbl 与 MeCbl 的降解规律，为建立相应的保护体系提供理论依据。(3)构建高灵敏的多形态分析方法，推进 LC-MS/MS 或高分辨质谱技术在食品中多形态 B_{12} 的应用。(4)开发或纯化多形态 B_{12} 的独立内标物，建立适用于多基质的内标校正策略，提高检测的准确性。(5)面向应用场景完善基础数据与质量评估，包括评估各类食品中维生素 B_{12} 的准确含量与真实形态分布，食品加工过程中的 B_{12} 稳定性监控；素食及植物基食品的强化策略；食品链中 B_{12} 形态转化及其营养贡献度评估等。

综上所述，食品中维生素 B_{12} 的多形态定量检测正从传统的总量测定向“绿色化、高灵敏、多形态、标准化”方向转变。未来的研究将不仅关注检测技术本身，更注重其在营养评价、食品开发和公共健康领域的应用价值，从而推动维生素 B_{12} 研究体系的全面提升。

参考文献

[1] SANTOS AJM, SILVA CLM, MENDES E. The importance, prevalence and determination of vitamins B_6 and B_{12} in food matrices: A review [J]. Food Chemistry, 2023, 426: 136606.

[2] WANG X, YANG J, ZHANG Y, *et al*. Accurate determination of vitamin B_{12} in infant formula by liquid chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 171: 114170.

[3] PAWLAK R, PARROT SJ, RAJ S, *et al*. How prevalent is vitamin B_{12} deficiency among vegetarians? [J]. Nutrition Reviews, 2013, 71(2): 110–117.

[4] TEMOVA RŽ, ROŠKAR R, HICKEY N, *et al*. Vitamin B_{12} in foods, food supplements, and medicines—a review of its role and properties with a focus on its stability [J]. Molecules, 2022, 28(1): 240.

[5] JÄGERSTAD M, ARKBÅGE K. Cobalamins: Properties and determi nation [M]. Amsterdam: Encyclopedia of Food Sciences and Nutritio n, 2003. https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00257-1

[6] ALLEN LH. Causes of vitamin B_{12} and folate deficiency [J]. Food and Nutrition Bulletin, 2008, 29(2_suppl1): S20–S34.

[7] ZHANG R, MA X, ZOU Y, *et al*. Total serum vitamin B_{12} (cobalamin) LC-MS/MS assay as an arbiter of clinically discordant immunoassay results [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2023, 61(1): 86–92.

[8] MATTHEWS RG, KOUTMOS M, DATTA S. Cobalamin-dependent and cobamide-dependent methyltransferases [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2008, 18(6): 658–666.

[9] PINCHEN H, FINGLAS P. Water-soluble vitamins [M]. Amsterdam: Encyclopedia of Food Chemistry, 2019.

[10] LI Y, GILL BD, MANLEY-HARRIS M, *et al*. A cyanide-free sample preparation methodology prior to determination of vitamin B_{12} in infant milk formula using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Talanta, 2025, 282: 126970.

[11] VERHOEF P, STAMPFER MJ, BURING JE, *et al*. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: Relation with vitamins B_6, B_{12} and folate [J]. American Journal of Epidemiology, 1996, 143(9): 845–859.

[12] BANERJEE R, RAGSDALE SW. The many faces of vitamin B_{12}: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes [J]. Annual Review of Biochemistry, 2003, 72: 209–247.

[13] HUMPHREY LL, FU R, ROGERS K, *et al*. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis [J]. Mayo Clinic Proceedings, 2008, 83(11): 1203–1212.

[14] FROESE DS, GRAVEL RA. Genetic disorders of vitamin B_{12} metabolism: Eight complementation groups-eight genes [J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2010, 12: e37.

[15] GREEN R, DATTA MA. Megaloblastic anemias: Nutritional and other causes [J]. Medical Clinics of North America, 2017, 101(2): 297–317.

[16] GREEN R, ALLEN L, BJØRKE-MONSEN AL, *et al*. Vitamin B_{12} deficiency [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3: 17040.

[17] SCALABRINO G, PERACCHI M. New insights into the pathophysiology of cobalamin deficiency [J]. Trends in Molecular Medicine, 2006, 12(6): 247–254.

[18] WATKINS D, ROSENBLATT DS. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism [J]. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2011, 157(1): 33–44.

[19] LANGAN RC, GOODBRED AJ. Vitamin B_{12} deficiency: Recognition and management [J]. American Family Physician, 2017, 96(6): 384–389.

[20] COMBS GF, MCCLUNG JP. General properties of vitamins [M]. San Diego: Academic Press, 2017.

[21] KOZYRAKI R, CASES O. Vitamin B_{12} absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders [J]. Biochimie, 2013, 95(5): 1002–1007.

[22] BELITZ HD, GROSCH W, SCHIEBERLE P. Food chemistry [M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

[23] CZERWONKA M, SZTERK A, WASZKIEWICZ-ROBAK B. Vitamin B_{12} content in raw and cooked beef [J]. Meat Science, 2014, 96(3): 1371–1375.

[24] GILLE D, SCHMID A. Vitamin B_{12} in meat and dairy products [J]. Nutrition Reviews, 2015, 73(2): 106–115.

[25] GUGGISBERG D, RISSE MC, HADORN R. Determination of vitamin B_{12} in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column [J]. Meat Science, 2012, 90(2): 279–283.

[26] LEBIEDZINSKA A, MARSZALL ML, KUTA J, *et al*. Reverse-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric, electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B_1, B_6 and B_{12} in animal and plant foods [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1173(1-2): 71–80.

[27] GENTILI A, CARETTI F. Analysis of vitamins by liquid chromatography [M]. Amsterdam: Liquid Chromatography, 2017.

[28] PAWLAK R, LESTER SE, BABATUNDE T. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B_{12}: A review of literature [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2014, 68: 541–548.

[29] QIU X, ZHANG H, YIN Y, *et al*. Determination of active B_{12} (cobalamin) in dietary supplements and ingredients by reversed-phase liquid chromatography: Single-laboratory validation [J]. Food Chemistry, 2019, 298: 125010.

[30] LUO X, CHEN B, DING L, *et al*. HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B_{12} in food products and multivitamins-multimineral tablets [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 562(2): 185–189.

[31] HEUDI O, KILINÇ T, FONTANA 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(1-2): 63–68.

[32] ANKLAM EHD, BELITZ W, GROSCH P. Schieberle: Food chemistry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 381(1): 10–11.

[33] 刘兆宏, 花锦. HPLC-DAD 法测定草鱼肉质中的维生素 B_1 和维生素 B_{12} 的含量[J]. 中国饲料, 2024(20): 79–83.
LIU ZH, HUA J. Determination of vitamin B_1 and vitamin B_{12} in grass carp by HPLC-DAD [J]. China Feed, 2024(20): 79–83.

[34] GENTILI A, CARETTI F, D'ASCENZO G, *et al*. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(13): 2029–2043.

[35] NAKOS M, PEPELANOVA I, BEUTEL S, *et al*. Isolation and analysis of vitamin B_{12} from plant samples [J]. Food Chemistry, 2017, 216: 301–308.

[36] 刘春丽, 陈汉峰, 杨静, 等. 高效液相色谱法测定饮料中维生素 B_{12} 的方法验证[J]. 饮料工业, 2024, 27(4): 19–23.
LIU CL, CHEN HF, YANG J, *et al*. Method validation of determination of vitamin B_{12} content in beverages by high performance liquid chromatography [J]. Beverage Industry, 2024, 27(4): 19–23.

[37] 顾文, 林丙文, 周亮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蛋白型固体饮料中的维生素 B_{12}[J]. 中国标准化, 2022(4): 246–252.
GU W, LIN BW, ZHOU L, *et al*. Determination of vitamin B_{12} in protein solid drink by UPLC-MS [J]. China Standardization, 2022(4): 246–252.

[38] 李江, 张莉, 王艳. 酶联免疫吸附法检测婴幼儿奶粉中维生素 B_{12}[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(5): 45–48.
LI J, ZHANG L, WANG Y. Determination of vitamin B12 in infant milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay [J].

[39] NISHIOKA M, KANOSUE F, YABUTA Y, *et al*. Loss of vitamin B_{12} in fish (round herring) meats during various cooking treatments [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2011, 57(6): 432–436.

[40] NISHIOKA M, KANOSUE F, YABUTA Y, *et al*. Loss of vitamin B_{12} in fish (round herring) meats during various cooking treatments [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2011, 57(6): 432–436.

[41] AOAC International. Official methods of analysis: Folate (pteroylglutamic acid) in vitamin preparations-microbiological method (Method 986.23) [M]. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2019

[42] AOAC International. Official methods of analysis: Microbiological method for niacin and niacinamide in vitamin preparations (Method 952.20) [M]. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2019.

[43] 黄进丽, 杨祖伟, 陈叶兰, 等. 微生物法检测叶酸、生物素、维生素 B_{12} 接种液制备方法的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 99–105.
HUANG JL, YANG ZW, CHEN YL, *et al*. Optimization of preparation method of inoculating solution for microbial detection of folic acid, biotin and vitamin B_{12} [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(1): 99–105.

[44] 韩冀, 石磊, 梁启美, 等. 宠物食品中维生素 B_{12} 的快速测定[J]. 食品安全导刊, 2022(25): 51–54.
HAN J, SHI L, LIANG QM, *et al*. Rapid determination of vitamin B_{12} in pet food [J]. China Food Safety Magazine, 2022(25): 51–54.

[45] 李丰, 徐瑞丽, 罗娟, 等. 直接提取微生物法测定保健食品中 VB_{12}[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(6): 103–107.
LI F, XU RL, LUO J, *et al*. Determination of VB_{12} in health food by direct extraction microbiological method [J]. China Food Additives, 2021, 32(6): 103–107.

[46] 励炯, 林伟杰, 曹青文, 等. 免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中的维生素 B_{12} 总量[J]. 营养学报, 2020, 42(1): 72–77.
LI J, LIN WJ, CAO QW, *et al*. Determination of total vitamin B_{12} in milk powder by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after purification on an immunoaffinity column [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2020, 42(1): 72–77.

[47] 王珏. 维生素 B_{12} 检测方法发展现状研究[J]. 食品安全导刊, 2023(13): 186–189.
WANG J. Research on the development status of vitamin B_{12} detection methods [J]. China Food Safety Magazine, 2023(13): 186–189.

[48] 苏妙仪, 严家俊, 綦艳. 微生物法测定乳粉中维生素 B_{12} 的实验室验证及结果分析[J]. 现代食品, 2022, 28(21): 192–197.

SU MY, YAN JJ, QI Y. Laboratory verification and analysis of vitamin B_{12} in milk powder by microbiological method [J]. Modern Food, 2022, 28(21): 192–197.

[49] 李一鸣, 张国梅, 郑永豪, 等. 抗坏血酸包裹的铜纳米簇作为荧光探针定量测定维生素 B_{12}[J]. 分析科学学报, 2022, 38(5): 545–551.
LI YM, ZHANG GM, ZHENG YH, *et al*. Ascorbic acid stabilized copper nanoclusters as fluorescent probes for vitamin VB_{12} detection [J]. Journal of Analytical Science, 2022, 38(5): 545–551.

[50] ARKBÅGE K, WITTHÖFT C, FONDÉN R, *et al*. Retention of vitamin B_{12} during manufacture of six fermented dairy products using a validated radio protein-binding assay [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(2-3): 101–109.

[51] 谢颖君, 东方宁, 刘春丽, 等. 微生物试管法在饮料中维生素 B_{12} 含量检测的应用研究[J]. 饮料工业, 2024, 27(6): 26–30.
XIE YJ, DONG FN, LIU CL, *et al*. Research on the application of microbial method based on national standard optimization in the detection of vitamin B_{12} [J]. Beverage Industry, 2024, 27(6): 26–30.

[52] TEMOVA RŽ, GROBIN A, ROŠKAR R. A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method [J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127768.

[53] HADINATA LA, CHANDRA-HIOE MV, ARCOT J. Sorbitol enhances the physicochemical stability of B_{12} vitamers [J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2020, 90(5-6): 439–447.

[54] AHMAD I, HUSSAIN W, FAREEDI AA. Photolysis of cyanocobalamin in aqueous solution [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1992, 10(1): 9–15.

[55] JUZENIENE A, NIZAUSKAITE Z. Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions and in human blood [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013, 122: 7–14.

[56] AHMAD I, QADEER K, ZAHID S, *et al*. Effect of ascorbic acid on the degradation of cyanocobalamin and hydroxocobalamin in aqueous solution: A kinetic study [J]. American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Sciences & Technology, 2014, 15(5): 1324–1333

[57] QADEER K, ARSALAN A, AHMAD I, *et al*. Photochemical interaction of cyanocobalamin and hydroxocobalamin with cysteine [J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1228: 129441.

[58] AHMAD I, HAFEEZ A, AKHTER N, *et al*. Effect of riboflavin on the photolysis of cyanocobolamin in aqueous solution [J]. Open Analytical Chemistry Journal, 2012, 6(1): 22–27.

[59] RUCKER RB, ZEMPLENI J, SUTTIE JW, *et al*. Handbook of vitamins [M]. Boca Raton, FL: Taylor & Francis (CRC Press), 2007.

[60] BAJAJ SR, SINGHAL RS. Degradation kinetics of vitamin B_{12} in model systems of different pH and extrapolation to carrot and lime juices [J]. Journal of Food Engineering, 2020, 272: 109800.

[61] BROWN KL, ZOU X. Thermolysis of coenzymes B_{12} at physiological temperatures: Activation parameters for cobalt-carbon bond homolysis [J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(27): 6372–6381.

[62] European Food Safety Authority. Deoxyadenosylcobalamin and methylcobalamin as sources for vitamin B_{12} added as a nutritional substance in food supplements [J]. EFSA Journal, 2008, 6(10): 815.

[63] COMBS GF. Chemical and physiological properties of vitamins [M]. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health, 2008.

[64] Vitamin B_{12}: A review of analytical methods for use in food [EB/OL]. [2022-04-25]. https://www.gov.uk/government/publications/vitamin-B_{12}-a-review-of-analytical-methods-for-use-in-food

[65] SCHNELLBAECHER A, BINDER D, BELLMAINE S, *et al*. Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(7): 1537–1555.

[66] SCHNEIDER Z, STROINSKI A. Comprehensive B_{12}: Chemistry, biochemistry, nutrition, ecology, medicine [M]. Walter de Gruyter, 2011.

[67] ICHIKAWA M, IDE N, SHIRAISHI S, *et al*. Effect of various halide salts on the incompatibility of cyanocobalamin and ascorbic acid in aqueous solution [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53(6): 688–690.

[68] BONNETT R. The chemistry of the vitamin B_{12} group [J]. Chemical Reviews, 1963, 63(6): 573–605.

[69] LEE W, LEE YB, HUH MH, *et al*. Determination of the chemical stability of cyanocobalamin in medical food by a validated immunoaffinity column-linked HPLC method [J]. Journal of Food Quality, 2022, 2022: 1619936.

[70] MONAJJEMZADEH F, EBRAHIMI F, ZAKERI-MILANI P, *et al*. Effects of formulation variables and storage conditions on light protected vitamin B_{12} mixed parenteral formulations [J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2014, 4(4): 329–338.

[71] 李樑, 邓文娟, 邱志超, 等. 免疫亲和柱净化-电感耦合等离子体质谱法测定婴幼儿配方奶粉中维生素 B_{12} 的总量[J]. 理化检验-化学分册, 2025, 61(10): 1222–1229.
LI L, DENG WJ, QIU ZC, *et al*. Determination of total vitamin B12 in infant formula milk powder by inductively coupled plasma mass spectrometry with immunoaffinity column purification [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2025, 61(10): 1222–1229.

[72] FAN Z, LI Y, WANG X, *et al*. Simultaneous determination of three active forms of vitamin B_{12} *in situ* produced during fermentation by LC-MS/MS [J]. Foods, 2025, 14(2): 309.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)