

# 微生物法测定婴幼儿乳粉中维生素 B<sub>12</sub> 含量的 不确定度评定

罗彤<sup>1,2\*</sup>, 付文雯<sup>1,2</sup>, 黄坤<sup>1,2</sup>, 朱影<sup>1,2</sup>, 王鸣秋<sup>1,2</sup>, 刘艳<sup>1,2</sup>, 李诗瑶<sup>1,2</sup>,  
邵翠翠<sup>1,2</sup>, 朱必婷<sup>1,2</sup>, 何名扬<sup>1,2</sup>, 马弋<sup>1,2</sup>

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075;  
2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 武汉 430075)

**摘要: 目的** 建立微生物法测定婴幼儿乳粉中维生素 B<sub>12</sub> 含量的不确定评定方法。**方法** 依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》及 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<sub>12</sub> 的测定》分析微生物法测定婴幼儿乳粉中维生素 B<sub>12</sub> 含量过程中产生的各测量不确定度分量, 计算测量结果的合成标准不确定度和扩展不确定度。**结果** 当样品中维生素 B<sub>12</sub> 含量为 3.97 μg/100 g 时, 其扩展不确定度为 0.53 μg/100 g (k=2)。**结论** 标准溶液配制和标准曲线拟合计算待测溶液含量产生的不确定度对检测结果影响较大。

**关键词:** 微生物法; 婴幼儿乳粉; 维生素 B<sub>12</sub>; 不确定度; 莱士曼氏乳酸杆菌

## Uncertainty evaluation for determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant milk powder by microbiological method

LUO Tong<sup>1,2\*</sup>, FU Wen-Wen<sup>1,2</sup>, HUANG Kun<sup>1,2</sup>, ZHU Ying<sup>1,2</sup>, WANG Ming-Qiu<sup>1,2</sup>, LIU Yan<sup>1,2</sup>,  
LI Shi-Yao<sup>1,2</sup>, SHAO Cui-Cui<sup>1,2</sup>, ZHU Bi-Ting<sup>1,2</sup>, HE Ming-Yang<sup>1,2</sup>, MA Yi<sup>1,2</sup>

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China; 2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an uncertain assessment method for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant milk powder by microbiological method. **Methods** According to JJF 1059.1—2012 *Evaluation and representation of measurement uncertainty* and GB 5413.14—2010 *National food safety standard for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant food and dairy products*, the components of measurement uncertainty generated during the determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant milk powder by microbial method were analyzed, and the synthetic standard uncertainty and extended uncertainty of the measured results were calculated. **Results** When the vitamin B<sub>12</sub> content of the sample was 3.97 g/100 g, the expansion uncertainty was 0.53 g/100 g (k=2). **Conclusion** The uncertainties caused by the preparation of standard solution and the calculation of standard curve fitting have a great influence on the test results.

**KEY WORDS:** microbiological method; infant milk powder; vitamin B<sub>12</sub>; uncertainty; *Lactobacillus leichmannii*

\*通信作者: 罗彤, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: camelcipher@163.com

\*Corresponding author: LUO Tong, Engineer, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China. E-mail: camelcipher@163.com

## 0 引言

维生素B<sub>12</sub>是自然界中唯一含有金属元素的咕啉类化合物的总称,分子中心含有金属钴原子故又被称为钴胺素<sup>[1]</sup>。配方乳粉是婴幼儿的主要营养来源,婴幼儿缺乏维生素B<sub>12</sub>会引起精神情绪异常、表情呆滞、反应迟钝和贫血<sup>[2]</sup>,摄入过量维生素B<sub>12</sub>也有副作用,会导致叶酸缺乏<sup>[1]</sup>。我国的婴幼儿配方乳粉产品实行配方注册管理,食品安全国家标准对婴幼儿配方食品、较大婴儿和幼儿配方食品中维生素B<sub>12</sub>的含量有强制性规定。维生素B<sub>12</sub>的检验方法包括紫外分光光度法、微生物法、液相色谱法和试剂盒法等<sup>[3-11]</sup>,目前婴幼儿乳粉中维生素B<sub>12</sub>的含量采用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<sub>12</sub>的测定》<sup>[3]</sup>规定的方法测定,其原理是利用莱士曼氏乳酸杆菌对维生素B<sub>12</sub>的特异性和灵敏性,定量测定出试样中维生素B<sub>12</sub>的含量。目前有关微生物检测婴幼儿乳粉中维生素B<sub>12</sub>含量的不确定度评价研究较少,该方法灵敏度高、前处理复杂、技术难度大、影响因素多,因此本研究参照JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》<sup>[12]</sup>及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<sub>12</sub>的测定》<sup>[3]</sup>的要求评定婴幼儿乳粉中维生素B<sub>12</sub>检测的不确定度,找到关键控制环节,以期为检测质量控制提供科学依据,提高检测质量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

市售婴幼儿配方乳粉;维生素B<sub>12</sub>标准品(≥99.0%)(大连美仑生物技术有限公司);莱士曼氏乳酸杆菌ATCC7830、维生素B<sub>12</sub>、测定用培养基、乳酸杆菌肉汤培养基(北京陆桥技术股份有限公司);氯化钠、无水磷酸氢二钠、无水偏重亚硫酸钠、柠檬酸(含一个结晶水)混合溶液(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

日立UH5300紫外分光计、TOMY SX-700高压灭菌锅、BeckmanAllegra X-15R离心机、梅特勒-托利多XS204分析天平、Talboys数显型多管式旋涡混合器;PHSJ-4F实验室pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 前处理方法

称量2g左右的样品加入10mL混合溶液(无水磷酸氢二钠、无水偏重亚硫酸钠、柠檬酸溶液)混合后,再加入150mL水,于121℃水解10min,冷却后调pH至4.5±0.2,用水定容至250mL,过滤。移取滤液5mL,加入水20~30mL,调pH至6.8±0.2后用水定容至100mL。逐级稀释

样品溶液,使得待测溶液中维生素B<sub>12</sub>的质量浓度为0.01~0.02ng/mL,待测。

#### 1.3.2 系列标准工作溶液和样品测定液的制作与测定

参照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<sub>12</sub>的测定》<sup>[3]</sup>,将系列标准工作溶液和样品测定液分别加入维生素B<sub>12</sub>测定用培养基,灭菌后迅速冷却至30℃以下。向上述试管中加入50μL莱士曼氏乳酸杆菌测试菌液,放入恒温培养箱中(36±1)℃培养19~20h。分光光度计在550nm处测定培养液的吸光度值,以维生素B<sub>12</sub>含量为横坐标,培养液吸光度值为纵坐标,拟合标准曲线,计算样品中维生素B<sub>12</sub>含量。

#### 1.3.3 数学模型的建立

维生素B<sub>12</sub>含量的计算公式为

$$X = \frac{C}{m} \times \frac{f}{1000} \times \frac{1}{R} \times 100$$

式中:

X-样品中维生素B<sub>12</sub>的含量,μg/100g;

C-样品溶液的含量,ng;

m-样品的称样质量,g;

f-稀释倍数;

1/R-回收率校正因子。

## 2 结果与分析

### 2.1 不确定度来源分析与评估

维生素B<sub>12</sub>含量测定的不确定度 $u_{rel}(X)$ 主要来源于包括:(1)待测溶液的含量产生的不确定度 $u_{rel}(C)$ ,包括标准溶液配制对待测溶液含量产生的不确定度 $u_1(C)$ 和标准曲线计算待测溶液含量产生的相对标准不确定度 $u_2(C)$ ;(2)样品前处理产生的不确定度 $u_{rel}(f)$ ,包括称量样品产生的相对标准不确定度 $u_{rel1}(f)$ 和稀释样品产生的相对标准不确定度 $u_{rel2}(f)$ ;(3)测量重复性产生的不确定度 $u_{rel}(b)$ ;(4)回收率产生的不确定度 $u_{rel}(R)$ 。

### 2.2 不确定度的计算

#### 2.2.1 待测溶液含量产生的相对标准不确定度 $u_{rel}(C)$

$u_{rel}(C)$ 由标准溶液配制对待测溶液含量产生的不确定度 $u_{rel1}(C)$ 和标准曲线计算待测溶液含量产生的相对标准不确定度 $u_{rel2}(C)$ 2个部分组成。

##### 2.2.1.1 标准溶液配制产生的相对标准不确定度 $u_{rel1}(C)$

标准溶液配制包括标准储备溶液、标准工作溶液和系列标准使用溶液的配制。

(1)标准储备溶液的配制:准确称取10.3mg维生素B<sub>12</sub>标准品(≥99.0%)于100mL容量瓶中,超纯水溶解定容即得维生素B<sub>12</sub>标准储备溶液,质量浓度为102.0μg/mL。

维生素B<sub>12</sub>标准品纯度产生的相对标准不确定度 $u_1(C_{1a})$ :维生素B<sub>12</sub>标准品含量≥99%,纯度中位值为

99.5%, 相对不确定度为 0.005, 按照均匀分布<sup>[13]</sup>考虑,  $k = \sqrt{3}$ , 其相对标准不确定度  $u_1(C_{1a}) = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 0.00289$ 。

称量维生素 B<sub>12</sub> 标准品产生的相对标准不确定度  $u_1(C_{1b})$ : 天平的相关说明书显示最大允许误差为  $\pm 0.5$  mg, 按照矩形分布,  $k = \sqrt{3}$ 。其标准不确定度和相对不确定度分别为:

$$u_{1m}(C_{1b}) = \frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 0.00029 \text{ g}$$

$$u_1(C_{1b}) = \frac{u_{1m}(C_{1b})}{m_1} = \frac{0.00029}{0.0103} = 0.02816。$$

定容标准储备溶液产生的相对标准不确定度  $u_1(C_{1c})$ : 100 mL A 级单标容量瓶容量允差为  $\pm 0.10$  mL, 其标准不确定度为  $\frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.05774$  mL。实验室温度控制在  $(20 \pm 2)$  °C, 20 °C 时水和硼硅玻璃的体积膨胀系数分别为  $2.1 \times 10^{-4}$  和  $1.0 \times 10^{-5}$ , 水的膨胀系数远大于硼硅玻璃的膨胀系数, 因此只需要考虑水的体积膨胀。100 mL 容量瓶因体积膨胀产生的标准不确定度为  $\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 100}{\sqrt{3}} = 0.02425$  mL, 相对标准不确定度为  $u_1(C_{1c}) = \frac{\sqrt{0.05774^2 + 0.02425^2}}{100} = 0.000063$ 。

因此标准储备溶液配制产生的相对标准不确定度:

$$u_1(C_1) = \sqrt{u_1(C_{1a})^2 + u_1(C_{1b})^2 + u_1(C_{1c})^2} = \sqrt{0.00289^2 + 0.02816^2 + 0.000063^2} = 0.02831。$$

(2) 标准工作溶液的配制: 将维生素 B<sub>12</sub> 102.0 μg/mL 标准储备溶液用单标线吸量管和容量瓶逐级稀释得到质量浓度为 1.020 ng/mL 维生素 B<sub>12</sub> 标准工作溶液。依据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》<sup>[14]</sup>, 在标准储备溶液稀释过程中所使用的各计量器具校准的不确定度计算结果见表 1。故溶液稀释产生的相对标准不确定度为:

$$u_2(C_2) = \sqrt{3 \times 0.00405^2 + 2 \times 0.00063^2 + 0.00118^2} = 0.00717。$$

(3) 标准系列使用溶液配制: 用 2 mL 分度吸管分别吸取标准工作溶液(1.020 ng/mL) 1.0、2.0 mL 于 100 mL 容量瓶中超纯水定容、摇匀后分别得到质量浓度为 0.0102、0.0204 ng/mL 的标准使用溶液。

标准曲线制作: 分别从 0.0102 ng/mL 的标准使用溶液吸取 1、2、3、4、5 mL, 从 0.0204 ng/mL 的标准使用溶液吸取 3、4、5 mL 于试管中, 加入维生素 B<sub>12</sub> 培养基, 补水至 10 mL。在标准系列使用溶液配制过程中使用的各计量器具不确定度计算结果见表 2。故由系列溶液配制产生的相对标准不确定度为

$$u_1(C_3) = \sqrt{2 \times 0.00693^2 + 2 \times 0.00347^2 + 2 \times 0.00482^2 + 2 \times 0.00362^2 + 2 \times 0.00290^2 + 2 \times 0.00063^2} = 0.01450。$$

因此, 标准溶液配制对待测溶液含量产生的不确定度为

$$u_{rel1}(C) = \sqrt{u_1(C_1)^2 + u_1(C_2)^2 + u_1(C_3)^2} = \sqrt{0.02831^2 + 0.00717^2 + 0.01450^2} = 0.0326。$$

2.2.1.2 标准曲线拟合计算待测溶液含量产生的相对标准不确定度  $u_{rel2}(C)$

对含量为 0.0102、0.0204、0.0306、0.0408、0.0510、0.0612、0.0816、0.102 ng 的标准维生素 B<sub>12</sub> 溶液和待测溶液培养, 19~20 h 后测定培养液吸光度值。

以吸光度为纵坐标, 待测溶液含量  $C$  为横坐标, 测定数据见表 3。采用线性拟合标准曲线得到回归方程  $Y = 3.2867X - 0.0255$ , 相关系数  $r^2$  为 0.9988, 记为  $Y = BX + A$  ( $A$  为截距,  $B$  为斜率), 其中  $B = 3.2867$ ,  $A = -0.0255$ 。对待测溶液中维生素 B<sub>12</sub> 含量进行 2 次测定, 结果分别为 0.020 ng 和 0.021 ng, 平均值为  $C_0$  0.0205 ng。由标准曲线拟合计算待测溶液含量产生的标准不确定度为<sup>[15]</sup>:

$$u(C) = \frac{S}{B} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (Cx_i - \bar{x})^2}}$$

式中:

$S$ - 标准溶液吸光值残差的标准差,

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(Y_i - (BC_i + A))]^2}{n-2}} = 0.00396;$$

$B$ - 标准曲线的斜率, 3.2867;

$A$ - 标准曲线的截距, -0.0255;

$N$ - 对  $C_0$  的测定次数, 2;

$n$ - 标准工作溶液的测试次数, 8;

$\bar{X}$ - 标准系列溶液的平均含量,  $\bar{X} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}} = 0.049676$  ng,  $(C_0 - \bar{X})^2 = 0.0008512$ ,  $\sum_{i=1}^n (Cx_i - \bar{x})^2 = 0.006736$ 。

因此, 由标准曲线拟合计算待测溶液含量产生的不确定度和相对不确定度分别为:

$$u(C) = \frac{0.00396}{3.2867} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{8} + \frac{0.0008512}{0.006736}} = 0.00112;$$

$$u_{rel2}(C) = u(C)C_0 = 0.0546。$$

综上所述, 由待测溶液含量产生的相对标准不确定度为

$$(C) = u_{rel1}(C)^2 + u_{rel2}(C)^2 = \sqrt{0.0326^2 + 0.0546^2} = 0.06360。$$

2.2.2 样品前处理产生的相对标准不确定度  $u_{rel}(f)$

样品前处理产生的相对标准不确定度包括称量样品产生的相对标准不确定度  $u_{rel1}(f)$  和稀释样品产生的相对标准不确定度  $u_{rel2}(f)$ 。

2.2.2.1 称量样品产生的相对标准不确定度  $u_{rel1}(f)$

所使用天平最大允许误差为  $\pm 0.5$  mg。其标准不确定度为  $u_1(f) = \frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 0.00029$  g。样品的称样量为 2.6042 g。因此称量样品产生的相对标准不确定度为:  $u_{rel1}(f) = \frac{0.00029}{2.6042} = 0.00011$ 。

表 1 计量器具校准在标准储备溶液稀释产生的不确定度  
Table 1 Uncertainty of calibration from the dilution of stock solution

来源	使用次数	容量误差			温度误差			合成不确定度	相对合成不确定度	
		容量允差/mL	计算方式	不确定度/mL	温度波动/°C	水体积膨胀系数/°C <sup>-1</sup>	计算方式			不确定度/mL
1 mL 单标线吸量管	3	±0.007	$0.007/\sqrt{3}$	0.00404	±2	$2.1 \times 10^{-4}$	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 1}{\sqrt{3}}$	0.00024	0.00405	0.00063
10 mL 容量瓶	1	±0.020	$0.020/\sqrt{3}$	0.01155	±2	$2.1 \times 10^{-4}$	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 10}{\sqrt{3}}$	0.00243	0.01180	0.00118
100 mL 容量瓶	2	±0.100	$0.100/\sqrt{3}$	0.05774	±2	$2.1 \times 10^{-4}$	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 100}{\sqrt{3}}$	0.02425	0.06263	0.00063

表 2 计量器具校准在标准系列使用溶液配制产生的不确定度  
Table 2 Uncertainty of calibration from the preparation of series standard solutions

来源	使用次数	容量误差			温度误差			合成不确定度	相对合成不确定度		
		吸取/定容体积	容量允差/mL	计算方式	不确定度/mL	温度波动/°C	水体积膨胀系数/°C <sup>-1</sup>			计算方式	不确定度/mL
2 mL 分度吸量管	2	1.0	±0.012	$0.012/\sqrt{3}$	0.00693	±2	$2.1 \times 10^{-4}$	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 1}{\sqrt{3}}$	0.00024	0.00693	0.00063
	2	2.0						$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 2}{\sqrt{3}}$	0.00048	0.00695	0.00347
	2	3.0						$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 3}{\sqrt{3}}$	0.00072	0.01445	0.00482
5 mL 分度吸量管	2	4.0	±0.025	$0.025/\sqrt{3}$	0.01443	±2	$2.1 \times 10^{-4}$	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 4}{\sqrt{3}}$	0.00096	0.01446	0.00362
	2	5.0						$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 5}{\sqrt{3}}$	0.00121	0.01448	0.00290
100 mL 容量瓶	2	100	±0.100	$0.100/\sqrt{3}$	0.05774	±2	$2.1 \times 10^{-4}$	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 100}{\sqrt{3}}$	0.02425	0.06263	0.00063

2.2.2.2 稀释样品产生的相对标准不确定度  $u_{rel}(f)$ 

称量一定量的样品经过溶解、水解、调节 pH 值后用水定容至 250 mL, 过滤。移取滤液 5 mL, 加入水 20~30 mL, 调 pH 值后用水定容至 100 mL。再移取上述溶液 1 mL 定容至 100 mL 容量瓶, 待测。

样品稀释所采用的各量具及温度影响产生的不确定度见表 4。其相对标准不确定度为:  $u_{rel2}(f) =$

$$\sqrt{\frac{0.00405^2 + 0.00290^2 + 2 \times 0.00063^2 + 0.000423^2}{0.00063^2 + 0.000423^2}} = 0.00508$$

因此, 样品前处理产生的相对标准不确定度为

$$u_{rel}(f) = u_{rel1}(f)^2 + u_{rel2}(f)^2 = \sqrt{0.00011^2 + 0.00508^2} = 0.00508$$

2.2.3 测量重复性产生的相对标准不确定度  $u_{rel}(b)$ 。

对同一样品进行维生素 B<sub>12</sub> 进行 6 次平行测定(n=6), 结果见表 5。按照贝塞尔公式<sup>[16]</sup>计算标准差

$$S(X) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.09812 \mu\text{g}/100 \text{ g}。对样品进行平行测量 2 次, 所以测量结果 X 对应的不确定度为$$

$$u_A(X) = \frac{SQ}{\sqrt{2}} = 0.0694 \mu\text{g}/100 \text{ g}。其相对不确定度为$$

$$u_{rel}(b) = u_A(X) / \bar{X} = 0.0174$$

2.2.4 回收率产生的不确定度  $u_{rel}(R)$ 

奶粉试样在 4.1  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  的水平上共进行 6 次加标实验, 回收率测定结果见表 6。加标回收的平均回收率为 94.57%, 应用贝塞尔公式<sup>[16]</sup>计算单个回收率的标准差为:

$$S(R) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}{n-1}} = 0.01352, \text{ 回收率的标准不确定度和相对标准不确定度分别为}$$

$$u(R) = S(\bar{R}) = \frac{S(R)}{\sqrt{n}} = 0.00552;$$

$$u_{rel}(R) = u(R) / \bar{R} = 0.00584。$$

## 2.2.5 合成不确定度

维生素 B<sub>12</sub> 相对不确定度汇总见表 7。各不确定度相互独立, 因此相对合成不确定度为:

$$u_{rel}(X) = u_{rel}(C)^2 + u_{rel}(f)^2 + u_{rel}(b)^2 + u_{rel}(R)^2 = \sqrt{0.06360^2 + 0.00508^2 + 0.0174^2 + 0.00584^2} = 0.06639。$$

## 2.2.6 扩展不确定度

合成标准不确定度为  $u_c(X) = u_{rel}(X) \times \bar{X} = 0.06639 \times 3.97 = 0.26 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ , 取包含因子  $k=2$ , 包含概率约 95%,  $U = u_{rel}(X) \times k = 2 \times 0.06639 = 0.13278$ , 样品中维生素 B<sub>12</sub> 的含量为 3.97  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ , 则扩展不确定度为:  $U \times 3.97 = 0.53 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。因此微生物法测定婴幼儿乳粉中维生素 B<sub>12</sub> 含量的测量结果可表示为  $(3.97 \pm 0.53) \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。

## 3 结 论

本研究评定了微生物法测定婴幼儿乳粉中维生素 B<sub>12</sub> 含量的不确定度。分析结果可知, 检测婴幼儿乳粉中维生素 B<sub>12</sub> 含量的不确定度主要来自于待测溶液含量因素, 组成待测溶液含量不确定度因素的标准溶液配制和标准曲线拟合计算待测溶液含量的相对标准不确定度分别为 0.0326 和 0.0546。微生物测定维生素 B<sub>12</sub> 是利用莱士曼氏乳酸杆菌在含有不同质量浓度维生素 B<sub>12</sub> 的测定用培养基生长产生透光率的原理, 而莱士曼氏乳酸杆菌生长产生的透光率受到培养基中维生素 B<sub>12</sub> 的含量和环境因素影响, 如培养温度、培养时间、pH 值、氧环境等。因此, 在日常实际检测中要加强人员的培训, 规范人员操作和控制实验条件, 对标准溶液配制和标准曲线校准过程的严格控制来保证结果的准确性。

表 3 标准曲线结果  
Table 3 Results of standard curve

含量 C/ng	平均吸光度	计算拟合吸光度	线性回归方程	相关系数 $r^2$
0.01019	0.012	0.011		
0.02038	0.038	0.044		
0.03057	0.079	0.078		
0.04076	0.105	0.112		
0.05095	0.137	0.145	$Y=3.3038X-0.0231$	0.9988
0.06114	0.178	0.179		
0.08152	0.242	0.246		
0.1019	0.312	0.314		

表 4 稀释样品产生的不确定度  
Table 4 Uncertainty of calibration from sample dilution

来源	使用次数	容量误差			温度误差			合成不确定度	相对合成不确定度	
		容量允差/mL	计算方式	不确定度/mL	温度波动/°C	水体积膨胀系数 /°C <sup>-1</sup>	计算方式			不确定度/mL
1 mL 单标线吸量管	1	±0.007	0.007/√3	0.00404	±2	2.1×10 <sup>-4</sup>	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 1}{\sqrt{3}}$	0.00024	0.00405	0.00405
5 mL 分度吸量管	1	±0.025	0.025/√3	0.01443	±2	2.1×10 <sup>-4</sup>	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 5}{\sqrt{3}}$	0.00121	0.01448	0.00290
100 mL 容量瓶	2	±0.100	0.100/√3	0.05774	±2	2.1×10 <sup>-4</sup>	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 100}{\sqrt{3}}$	0.02425	0.06263	0.00063
250 mL 容量瓶	1	±0.15	0.15/√3	0.0866	±2	2.1×10 <sup>-4</sup>	$\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 2 \times 250}{\sqrt{3}}$	0.06062	0.1057	0.000423

表5 样品中维生素 B<sub>12</sub> 重复性测试结果Table 5 Results of replicate determinations of vitamin B<sub>12</sub>

序号	维生素 B <sub>12</sub> 质量分数/(μg/100 g)
1	3.823
2	4.124
3	3.965
4	3.988
5	4.025
6	4.011
平均值	3.989

表6 维生素 B<sub>12</sub> 加标回收率测定结果Table 6 Recoveries of vitamin B<sub>12</sub> in spiked sample

加标 序号	1	2	3	4	5	6	$\bar{R}$
回收率 R/%	93.52	94.34	95.14	92.60	96.22	95.60	94.57

表7 维生素 B<sub>12</sub> 相对不确定度汇总Table 7 Summary of relatives uncertainty components for vitamin B<sub>12</sub> determination

不确定度分量	不确定度来源	维生素 B <sub>12</sub> 相对标准 不确定度
$u_{rel}(C)$	样品溶液的含量	0.06360
$u_{rel}(f)$	样品前处理	0.00508
$u_{rel}(b)$	测量重复性	0.0174
$u_{rel}(R)$	测量回收率	0.00584

## 参考文献

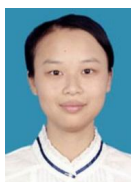
- [1] 黄娟, 卢沛明. 免疫亲和-HPLC 法测定婴幼儿配方乳粉中维生素 B<sub>12</sub>[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(11): 71-73.  
HUANG J, LU PM. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant formula milk powder by immunoaffinity column-high performance liquid chromatography [J]. Food Nutr China, 2015, 21(11): 71-73.
- [2] 王华, 陈辉, 李雪梅, 等. 维生素 B<sub>12</sub> 功能及营养作用研究[J]. 中国食物与营养, 2007, 2: 57-58.  
WANG H, CHEN H, LI XM, et al. The nutritional value and functions of vitamin B<sub>12</sub> [J]. Food Nutr China, 2007, 2: 57-58.
- [3] 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<sub>12</sub> 的测定[S].  
GB 5413.14—2010 National food safety standard-Determination of vitamin B<sub>12</sub> in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [4] 郝岩平, 姜金斗, 房玉国. HPLC 法测定婴幼儿配方奶粉复合维生素添加剂中维生素 B<sub>12</sub> 方法的研究[J]. 中国食品添加剂, 2004, 2: 93-96.  
HAO YP, JIANG JD, FANG YG, et al. Research on the determination method of vitamin B<sub>12</sub> in composite vitamin additives for milk powder and formula by HPLC [J]. China Food Addit, 2004, 2: 93-96.
- [5] 鲁盛静, 田野. 婴幼儿食品和乳制品中维生素 B<sub>12</sub> 测定的探讨[J]. 中国乳品工业, 2013, 42(2): 50-55  
LU SJ, TIAN Y. Discussion on determination of vitamin B<sub>12</sub> in foods for infants and young children, milk and milk products [J]. China Dairy Ind, 2013, 42(2): 50-55.
- [6] 刘娜, 陈大舟, 汤桦, 等. 婴儿配方奶粉中 8 种水溶性维生素的高效液

相色谱同时测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 408-411.

- LIU N, CHEN DZ, TANG H, et al. Simultaneous determination of eight water soluble vitamins in baby milk powder by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2008, 27(4): 408-411.
- [7] 江虹, 刘殿子顺, 李琴. 高灵敏双波长吸收光谱法测定药物中维生素 B<sub>12</sub>[J]. 分析科学学报, 2020, 36(4): 611-614.  
JIANG H, LIU YZS, LI Q. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in drugs by high sensitivity dual-wavelength absorption spectrometry [J]. J Anal Sci, 2020, 36(4): 611-614.
- [8] 张翔宇. 微生物法测定腐乳中维生素 B<sub>12</sub> 含量的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(16): 184-187.  
ZHANG XY. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in sufu by microbiological method [J]. Food Res Dev, 2020, 41(16): 184-187.
- [9] 曲勤凤, 徐琼, 张娜娜, 等. 微生物法测定发酵食品中维生素 B<sub>12</sub> 含量的研究[J]. 中国酿造, 2019, (6): 181-184.  
QU QF, XU Q, ZHANG NN, et al. Determination of vitamin B<sub>12</sub> content in fermented food by microbiological method [J]. China Brew, 2019, (6): 181-184.
- [10] 李江, 蔡艳, 田秀梅, 等. 酶联免疫法检测婴幼儿配方奶粉中的维生素 B<sub>12</sub>[J]. 食品工业, 2017, (8): 250-252.  
LI J, QI Y, TIAN XY, et al. Detection of vitamin B<sub>12</sub> in infant formula milk powder by enzyme linked immunosorbent assay [J]. Food Ind, 2017, (8): 250-252.
- [11] 顾娅楠, 战虎. 液相色谱法测定固体饮料中维生素 B<sub>12</sub> 的含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 149-152.  
GU YN, ZHAN H. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in solid beverage by HPLC [J]. Food Res Dev, 2018, 39(16): 149-152.
- [12] JJF 1059. 1—2012 测量不确定度评定与表示[S].  
JJF 1059.1—2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [13] 颜春荣, 徐春祥, 武中平, 等. 气质联用法测定含乳饮料中的邻苯二甲酸酯及其不确定度分析[J]. 乳业科学与技术, 2012, (1): 36-39.  
YAN CR, XU CX, WU ZP, et al. GC-MS determination and uncertainty analysis of phthalate acid esters in milk-containing beverages [J]. J Dairy Sci Technol, 2012, (1): 36-39.
- [14] JJG 196—2006 常用玻璃量器检定规程[S].  
JJG 196—2006 Working glass container [S].
- [15] 黄坤, 王会霞, 范小龙, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定炒货中纽甜含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 64-72.  
HUANG K, WANG HX, FAN XL, et al. Uncertainty evaluation for the determination of neotame content in roasted seeds and nuts by UPLC-MS/MS method [J]. Food Mach, 2019, 35(8): 64-72.
- [16] 邵亮亮, 赵美凤, 宁晖, 等. 高效液相色谱法测定小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的不确定度评定[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 232-237.  
SHAO LL, ZHAO MF, NING H, et al. Uncertainty evaluation for determining deoxynivalenol in wheat by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2016, 37(12): 232-237.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



罗 彤, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: camelcipher@163.com