

婴儿配方乳粉中维生素 B₁、B₂ 含量测定 能力验证

王海燕*, 高文超, 张会亮, 董亚蕾
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 设计组织婴儿配方乳粉中维生素 B₁、维生素 B₂ 含量测定能力验证项目, 评价实验室检测婴儿配方乳粉中维生素 B₁、维生素 B₂ 的技术能力和水平。**方法** 考核样品中的维生素 B₁、维生素 B₂ 在 $P < 0.05$ 显著水平时是否均匀, 且在整个计划周期内稳定, 满足能力验证的要求。通过实施能力验证计划, 对来自 27 个省(自治区)、直辖市的 33 家实验室的测定结果与指定值比对得到相对偏差, 评价实验室检测能力。**结果** 在参加实验室中, 维生素 B₁ 总体满意率为 90.6%; 维生素 B₂ 总体满意率为 84.8%。**结论** 多数参加实验室检测能力结果满意, 表明乳粉中维生素 B₁、维生素 B₂ 检测水平总体良好。对于离群结果进行技术分析, 可以帮助实验室查找原因并进行整改。

关键词: 能力验证; 婴儿配方乳粉; 维生素 B₁; 维生素 B₂; 指定值; 结果评价

Proficiency testing on the determination of vitamin B₁ and B₂ in infant formula milk powder

WANG Hai-Yan*, GAO Wen-Chao, ZHANG Hui-Liang, DONG Ya-Lei
(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To design and organize the proficiency testing program for determination of vitamin B₁ and B₂ in infant formula milk powder so as to assess the proficiency and level of the laboratories. **Methods** The vitamin B₁ and vitamin B₂ in the samples were tested to see whether they were uniform at the significant level of $P < 0.05$, stable in the whole planning period, and meeting the requirements of ability verification. Examining sample was conducted through the implementation of the plan of ability test and verify, 33 laboratories from 27 provinces and the autonomous region were measured and the results were compared with designated value and then got the relative deviation, which used for evaluating the laboratory testing capability. **Results** In all of the laboratories participated in the determination of vitamin B₁ and vitamin B₂, the total satisfactory rate of vitamin B₁ was 90.6%, while vitamin B₂ was 84.8%. **Conclusion** The majority of the participant laboratories pass the test with satisfactory results, indicating that the determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in milk powder shows an overall good level. The outlier results are analyzed to help laboratory find the cause and carry out rectification.

KEY WORDS: proficiency testing; infant formula milk powder; vitamin B₁; vitamin B₂; designated value; result evaluation

*通讯作者: 王海燕, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品、化妆品安全检测。E-mail: summerwhy163@163.com

*Corresponding author: WANG Hai-Yan, Ph.D, Associate Professor, National Institutes for Food and Drug Control, No.2, Tiantan Xili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: summerwhy163@163.com

1 引言

婴幼儿配方乳粉作为主要的母乳替代品,其质量安全与婴幼儿健康紧密相关。维生素 B₁(VB₁)是糖类代谢所需酶的重要组成成分,维生素 B₂(VB₂)是组织呼吸所需酶的重要组成成分。这 2 种组分人体自身均不能合成,需要通过外界间接获取或者直接补充^[1,2]。天然乳粉中 VB₁、VB₂ 含量较少,大部分需要人工添加^[3,4]。因此准确测定乳粉中 VB₁、VB₂ 的含量是乳粉质量控制单位的重要职责,也反映出检测机构的基本检验能力和素质。通过技术手段发现和评价乳粉中 VB₁、VB₂ 的含量情况具有切实意义。基于此,本研究组织和开展了能力验证工作。

能力验证共分为样品的设计和制备、均稳性考察、发放样品、回收结果并评价等环节。样品的均一性和稳定性在整个能力验证工作中是非常重要的,是确保最终结果可控、有效的必要元素^[5]。在发样前均对样品进行了均匀性和稳定性的考察,待发样品均符合要求。对回收回来的结果进行科学的统计分析和评价能在一定程度上正确认识各检测实验室对于乳粉中的 VB₁、VB₂ 检验的能力^[6,7]。

本次能力验证采用指定值的结果分析方法,通过测定有证参考物质,利用查找有证参考值来确定本次能力验证样品的指定值。该方法在参加者数量较少,结果不成正态分布时尤为适用,相比稳健统计法不受参加者数量、提交结果的限制,能较为真实的反应能力验证样品的真实结果。通过分析参加者的结果与指定值的相对偏差,可以得到参加者的整体数据趋势,为管理部门、评价机构判定实验室能力提供依据参考,参加单位也可以通过对结果的反馈、分析达到提高该项目检验水平的目的。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters 2695-2475 高效液相色谱仪-配荧光检测器(美国沃特世科技有限公司); C₁₈ 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国沃特世科技有限公司)。

VB₁(盐酸硫胺素)标准品(纯度≥99%, 美国 SIGMA 公司); VB₂(核黄素)标准品(纯度≥98%, 美国 Sigma 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司)。

2.2 能力验证样品

质控样品采用向主流乳粉企业采购分装前的 2 个段位成品乳粉,交予分包方进行二次混匀和分装。不同段位乳粉产品中维生素含量不同,待测维生素含量较低的乳粉被包装为低浓度样品(编号 0031B),含量较高的乳粉被包装为高浓度样品(编号 0031C)。

样品为乳白色粉末状,每瓶不少于 40 g,装于棕色玻璃瓶,并用铝塑袋真空包装,袋外标明样品代码,寄送前

常温避光保存。

2.3 均匀性考察

根据 CNAS-GL 003:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》^[8]的建议,从分装到最小包装的样品中随机抽取样品 12 瓶,另将每瓶样品取 2 份,测定 VB₁、VB₂ 的含量。本次均匀性考察采用单因素方差分析法。当测定结果的 *F* 值小于临界值时,认为样品是充分均匀的。

2.4 稳定性考察

样品制样完毕后,需定期对样品中的 VB₁、VB₂ 含量进行稳定性检验。在样品寄出前和接收到各参加实验室的结果数据后,分别对样品中的 VB₁、VB₂ 进行检测,考察样品的稳定性。每次取各浓度样品 3 份进行检验,检验结果与均匀性结果比较,采用 *t* 检验法考察样品的稳定性,*t* 值应均小于 95%置信区间查表值。

2.5 样品发送

本次能力验证设计样品进行统一编码标识,编码后两位为实验室代码。为提高本次能力验证结果的真实有效性,安排发放 2 个不同浓度范围的样品,每个实验室发放 1 瓶。实验室代码从小到大排列,前 16 家发放低浓度组样品,后 17 家发放高浓度样品。样品包装上标注有样品编号,不含组别提示。

2.6 检测方法

维生素 B₁ 采用 GB 5009.84-2016《食品中维生素 B₁ 的测定》^[9]第一法高效液相色谱法测定,维生素 B₂ 采用 GB 5009.85-2016《食品中维生素 B₂ 的测定》^[10]第一法高效液相色谱法测定。

2.7 指定值的确定

依据 GB/T 28043-2011《利用实验室间比对进行能力验证的统计方法》^[11]中“5.4 参照值”关于能力验证样品指定值确定方法的规定,随机抽取待定值样品,按照相同实验条件,在重复性条件下,与相同基质的有证标准物质(certified reference material, CRM)分别测试,本次能力验证使用的 CRM 为 NIST 标准品 SRM 1849a。SRM 1849a 的有证参照值见表 1。对照 CRM 的有证参照值来校准,得到本次能力验证样品的指定值 *X*, 见表 2。

2.8 评价依据

计算参加者结果与指定值的相对偏差:

$$d_r = \frac{x - X}{X} \times 100\%$$

式中: *d_r*-参加者测定结果与指定值的相对偏差, %;

x-参加者的测定结果, mg/100 g;

X-指定值, mg/100 g。

根据 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理

化检测》^[12]规定的测定值与真值的偏差指导范围, 对结果进行评价, d_r 在允许的偏差范围内的(含边界), 为满意结果, 否则为不满意结果。具体判定见表 2。

表 1 SRM 1849a 有证参照值
Table 1 Certified reference value of SRM 1849a

中文名称	英文名称	参照值/(mg/kg)
维生素 C	ascorbic acid(vitamin C)	784±65
维生素 B ₁	thiamine(vitamin B ₁)	12.57±0.98
维生素 B ₂	riboflavin(vitamin B ₂)	20.37±0.52
烟酰胺	niacinamide	109±10
泛酸	pantothenic acid	68.2±1.9
维生素 B ₆	pyridoxine(vitamin B ₆)	13.46±0.93
叶酸	folic acid	2.293±0.062
生物素	biotin	1.99±0.13
胆碱	choline ion	1090±110
肉碱	carnitine	136±14
维生素	retinol(vitamin A)	7.68±0.23
维生素 D ₃	cholecalciferol(vitamin D ₃)	0.111±0.017
维生素 K ₁	phyloquinone(vitamin K ₁)	1.06±0.17

表 2 允许的偏差范围
Table 2 Allowable deviation range

	指定值/(mg/100 g)	相对偏差范围/%
维生素 B ₁ 低 (0031B)	0.643	-20~+10
维生素 B ₁ 高 (0031C)	0.680	-20~+10
维生素 B ₂ 低 (0031B)	1.05	-15~+15
维生素 B ₂ 高 (0031C)	1.28	-15~+15

表 3 检测结果统计量汇总表
Table 3 Summary table of test result statistics

项目	结果个数	指定值 X /(mg/100 g)	变异系数 CV /%	最大值/(mg/100 g)	最小值/(mg/100 g)	极差/(mg/100 g)
维生素 B ₁ 低	16	0.643	8.92	0.747	0.507	0.240
维生素 B ₁ 高	16	0.680	14.08	0.968	0.550	0.418
维生素 B ₂ 低	16	1.05	8.94	1.19	0.853	0.337
维生素 B ₂ 高	17	1.28	15.53	1.40	0.686	0.714

2.9 统计学处理

本次能力验证计划的统计采用参考值方法, 以处理各参加实验室测试结果。本计划涉及的统计量有结果数、指定值、变异系数(coefficient of variation, CV)、最小值、最大值和极差等。

3 结果与分析

3.1 能力验证样品的均匀性和稳定性

3.1.1 均匀性分析

按照 CNAS—GL 003:2018 的要求进行均匀性实验, 结果表明: VB₁、VB₂ 2 个浓度水平的样品均匀性检验计算的 F 值均小于临界值 [$F_{0.05}(11, 12)=2.72$]。表明在 $P < 0.05$ 显著性水平时, 瓶间及瓶内样品中的 VB₁、VB₂ 含量是均匀的, 确保了参加实验室检测结果的可评价性。

3.1.2 稳定性分析

按照 CNAS—GL 003:2018 的要求进行稳定性实验。将稳定性数据进行 t 检验, t 值均小于 95% 置信区间查表值, 表明在本计划实施期间测试样品中的 VB₁、VB₂ 是稳定的。

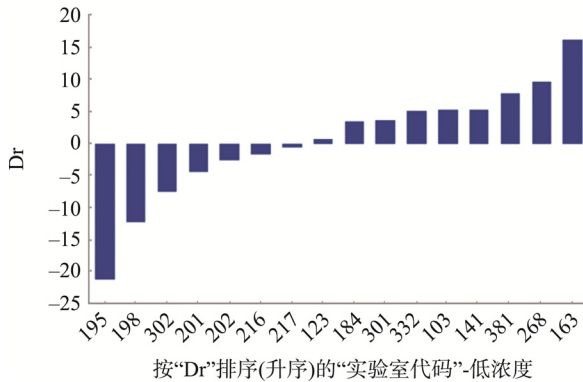
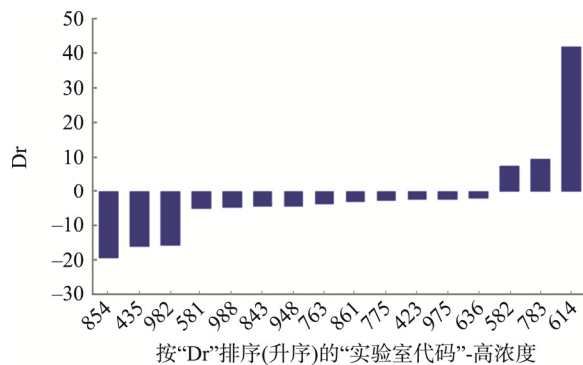
3.2 能力验证的统计结果

3.2.1 能力验证的总体统计量

对能力验证总体情况进行了统计, 包括结果个数、指定值(X)、变异系数(CV %)、最大值、最小值和极差, 具体见表 3。

3.2.2 实验室的能力评价

本次能力验证参加的 33 家实验室 VB₁ 结果 d_r 值柱状图见图 1, VB₂ 结果 d_r 值柱状图见图 2。通过柱状图, 可以清晰看出所有参加实验室结果的分布情况。作为参加单位, 易于将其结果与其他参加实验室进行比较, 了解其结果在本次计划中所处的水平。作为监管部门及方法制定者, 通过整体偏差情况分析结果离群的共性原因, 例如样品的前处理过程可能存在共性的问题会导致结果偏低等, 从而为今后工作提供技术支持。

图 1 维生素 B₁ 结果 d_r 值分布柱状图Fig.1 Histogram of d_r value distribution of vitamin B₁ results图 2 维生素 B₂ 结果 d_r 值分布柱状图Fig.2 Histogram of d_r Value distribution of vitamin B₂ results

3.3 实验结果分析

根据反馈的结果和相关记录,全部参加实验室均采用了推荐方法:GB 5009.84-2016《食品中维生素 B₁的测定》和 GB 5009.85-2016《食品中维生素 B₂的测定》。

33 家实验室反馈了维生素 B₁ 含量测定结果;32 家实验室反馈了维生素 B₂ 含量测定结果。参加实验室维生素 B₁ 含量平均值分别为 0.646 mg/100 g 和 0.670 mg/100 g;维生素 B₂ 含量平均值分别为 1.05 mg/100 g 和 1.13 mg/100 g。维生素 B₁ 低浓度组满意率为 87.5%,高浓度组满意率为 93.8%;维生素 B₂ 低浓度组满意率为 93.8%,高浓度组满意率为 76.5%。检测结果总体情况见表 4。

表 4 检测结果总体情况
Table 4 General situation of test results

项目	结果个数	满意结果数	满意率/%	总体满意率/%
维生素 B ₁ 低	16	14	87.5	90.6
维生素 B ₁ 高	16	15	93.8	
维生素 B ₂ 低	16	15	93.8	84.8
维生素 B ₂ 高	17	13	76.5	

3.3.1 对照品的选择

维生素 B₁ 对照品可能存在盐酸硫胺素、硝酸硫胺素等不同结构形式,本次能力验证规定,维生素 B₁ 结果以硫胺素计,避免因对照品不同引入的结果差异。如不进行折算,将导致结果偏高。

3.3.2 前处理方法分析

本次能力验证对检验方法进行了限定,从上交的原始记录来看,所有参加单位均参照规定的检验依据进行检验。规定方法的前处理步骤较多,每个步骤都可能对最终的结果造成影响。下面从以下几个方面分析可能影响结果的几个原因。

(1) 称样量的不同会引入一定误差。本次能力验证样品的基质为乳粉,从原始记录上看,部分实验室称样量较大,可能会造成溶解不充分、提取不完全的情况。同时,称样量的不同对水解时间、水解温度的要求均不同,酶解过程的不充分等均能导致结合的维生素 B₁、B₂ 不完全释放。

(2) 前处理过程中使用的酶对结果的影响。不同品牌的淀粉酶、木瓜蛋白酶的本底值不同,为避免因品牌和储存造成的酶的影响,建议实验中加做空白样品并扣除酶对结果的影响^[13]。

(3) 应注意水解液 pH 值的准确调节, pH 值影响最终悬浊液的形成。某些实验室在原始记录中没有记录调节最终 pH 值,难以进行溯源性核查和原因分析。

(4) 维生素 B₁、维生素 B₂ 在前处理和测定过程中需要避光操作,光照会对测定结果有一定影响。建议样品处理好后立即上机测定,久置会降低测定结果。

3.3.3 随行质控样的使用

7 家单位在样品测定的同时做了随行的质控样品,这 7 家单位的能力验证结果均为满意。2 家单位使用 NIST 标准品 SRM1849a,1 家单位使用 GBW(E)100227《多维元素片中烟酰胺、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆ 及 10 种无机成分标准物质》,1 家单位使用 QC-IP703《婴儿配方乳品质控样品》,1 家单位使用“婴幼儿谷类辅助食品中维生素 B₁、B₂、B₆、B₁₂、VC、生物素、烟酸、泛酸、叶酸质控样品”,2 家单位没有做出质控样的说明。在试验中增加随行回收率试验,采用基质相近的有证质控样品,对降低误差,考察方法的准确性,实验室的自身质量控制具有重要的意义^[14,15]。

4 结 论

本次结果在一定程度上反映了目前我国相关检测实验室对乳粉中维生素 B₁、维生素 B₂ 的检测能力。结果显示, 维生素 B₁、维生素 B₂ 满意率均较高, 表现出较高的检测水平, 检测能力评价为满意, 为我国乳粉中相应维生素含量的日常监管提供了强有力的支持。

参考文献

- [1] 张晓娜, 校瑞, 牛家华, 等. HPLC 同时测定维生素 B 片中 4 种水溶性维生素的含量[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2016, 46(5): 583-625.
Zhang XN, Jiao R, Niu JH, *et al.* Simultaneous determination of four water-soluble vitamins in vitamin B tablets by HPLC [J]. J Henan Univ (Nat Sci Ed), 2016, 46(5): 583-625.
- [2] 何宇纳, 王竹, 赵丽云, 等. 2010~2012 年中国居民膳食维生素摄入状况[J]. 营养学报, 2017, 39(2): 112-115.
He YN, Wang Z, Zhao LY, *et al.* Dietary vitamin intake status of Chinese residents from 2010 to 2012 [J]. J Nutr, 2017, 39(2): 112-115.
- [3] 缪璐, 莫佳琳, 周红尖, 等. 液质联用仪同步检测婴幼儿配方食品中 11 种水溶性维生素[J]. 现代食品科技, 2017, 31(7): 347-353.
Miao L, Mo JL, Zhou HJ, *et al.* Detection of 11 water-soluble vitamins in infant formula by liquid chromatography-mass spectrometer [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 31(7): 347-353.
- [4] Christopher J. Blake. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389: 63-76.
- [5] ISO/IEC 1703 合格评定能力验证的通用要求[S].
ISO/IEC 1703 General requirements for verification of conformity assessment capabilities [S].
- [6] CNAS-RL 02 能力验证规则[S].
CNAS-RL 02 Ability verification rule [S].
- [7] CNAS-CL 03:2010 能力验证提供者认可准则[S].
CNAS-CL 03:2010 Competency verification provider accreditation criteria [S].
- [8] CNAS-GL 003: 2018 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].
CNAS-GL 003: 2018 Guide for evaluating the homogeneity and stability

of capability verification samples [S].

- [9] GB 5009.84-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B₁ 的测定[S].
GB 5009.84-2016 National food safety standard-Determination of vitamin B1 in food [S].
- [10] GB 5009.85-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B₂ 的测定[S].
GB 5009.85-2016 National food safety standard-Determination of vitamin B2 in food [S].
- [11] GBT 28043-2011 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法[S].
GBT 28043-2011 A statistical method for ability verification using inter-laboratory comparisons [S].
- [12] GBT 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GBT 27404-2008 Specification for laboratory quality control-Chemical testing of food [S].
- [13] 杨红. 浅谈化学检测实验室的质量控制[J]. 现代测量与实验室管理, 2015, 23(2): 55-56.
Yang H. On the quality control of chemical testing laboratory [J]. Adv Meas Lab Manag, 2015, 23(2): 55-56.
- [14] 李莉, 赵晓宇, 李祥胜, 等. 奶粉中四环素检测能力验证研究[J]. 中国药事, 2017, 6(31): 617-621.
Li L, Zhao XY, Li XS, *et al.* Study on tetracycline detection in milk powder [J]. Chin Pharm Aff, 2017, 6(31): 617-621.
- [15] 田丽霞. 浅谈实验室内部质量控制管理[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 12(2): 429.
Tian LX. On the quality control tube in laboratory [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 12(2): 429.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



王海燕, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品、化妆品安全检测。
E-mail: summerwhy163@163.com