

利用不确定度比对乳粉中叶酸含量的快速检测方法

解 鑫, 喻东威, 马文丽, 赵 媛, 刘萍萍, 梁春梅, 宋晓东*

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011517)

摘要: 目的 利用不确定度比对乳粉中叶酸含量的快速检测方法。**方法** 分别用进口和国产的微生物法和酶联免疫法的试剂盒对代表性乳粉样品进行 3 d 3 平行检测, 对检测数据做正态分布分析及不确定度计算。**结果** 各方法检测结果正态分布检验值(Anderson-Darling, AD)均小于临界值 0.725(95%置信区间), 服从正态分布; 微生物快速检测方法不确定度范围为 13.3%~27.4%; 酶联免疫方法不确定度范围为 9.6%~31.3%。**结论** 微生物试剂盒快速检测方法, 具有稳定性较好, 品牌差异较小的特点, 适合质控品的长期监测, 质控图的建立。酶联免疫检测方法, 具有简单、快速的特点, 适合样品中叶酸的快速检测。

关键词: 乳粉; 叶酸; 微生物法; 酶联免疫法; 不确定度

Comparison of rapid detection methods of folic acid in milk powder by uncertainty

XIE Xin, YU Dong-Wei, MA Wen-Li, ZHAO Yuan, LIU Ping-Ping, LIANG Chun-Mei, SONG Xiao-Dong*

(Inner Mongolia MengNiu Dairy Products Co., Ltd, Hohhot 011517, China)

ABSTRACT: Objective To compare the rapid detection methods of folic acid in milk powder by uncertainty **Methods** Representative milk powder samples were tested for 3 d 3 in parallel using imported and domestic microbiological and enzyme-linked immunosorbent assay kits. Normal distribution analysis and uncertainty calculation for test data, and normal distribution analysis and uncertainty calculation were performed. **Results** The normal distribution test value (Anderson-Darling, AD) of each method was less than the critical value of 0.725 (95% confidence interval), which indicated the data subjected to normal distribution. The uncertainty of microbial rapid detection method ranged from 13.3% to 27.4%. The uncertainty of the immunization method ranged from 9.6% to 31.3%. **Conclusion** Rapid detection method of microbial kit has the characteristics of good stability and small brand difference, suitable for long-term monitoring of quality control products and establishment of quality control chart. The enzyme-linked immunosorbent assay has the characteristics of simple and rapid, and is suitable for rapid detection of folic acid in samples.

KEY WORDS: milk powder; folic acid; microbial method; enzyme-linked immunosorbent assay; uncertainty

基金项目: 2018 年国家重点研发计划重点专项(2018YFC1604202)

Fund: Supported by Key Special Project of National Key Research and Development Program in 2018 (2018YFC1604202)

*通讯作者: 宋晓东, 高级工程师, 硕士, 主要研究方向为实验室及安全质量管理工作。E-mail: songxiaodong@mengniu.cn

*Corresponding author: SONG Xiao-Dong, master, Senior engineer, Inner Mongolia MengNiu Dairy Products Co., Ltd, Hohhot 011517, China. E-mail: songxiaodong@mengniu.cn

1 引言

叶酸是一种有机化合物,对一些正常的身体机能,如核酸及蛋白质的合成、氨基酸的代谢来说是必不可少的^[1-3]。叶酸可以添加于乳粉中作为一种重要的营养强化剂,其功效主要是预防胎儿神经管畸形出生缺陷,发育迟缓以及预防贫血^[4-8]。国家卫生行业标准对人群叶酸营养缺乏有明确的判定指标和测定方法^[9]。食品中叶酸常见的检测方法有高效液相色谱法^[10]、液相色谱串联质谱法^[11]、酶联免疫法^[12]、免疫亲和层析法^[13]、微生物法^[14]等。乳粉中叶酸含量的标准检测方法通常为微生物法。

对于企业来讲,常采用商业化微生物法快速检测试剂盒检测乳粉中的叶酸,该方法基于国标微生物法原理,即叶酸是鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus casei* spp. *Rhannosus* (ATCC 7469)生长所必需的营养素,在一定控制条件下,将鼠李糖乳杆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),根据叶酸含量与透光率(或吸光度值)的标准曲线计算出试样中叶酸的含量^[14]。但该方法仍存在检测周期较长、步骤较多、人员要求较高等特点。因此,酶联免疫吸附方法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)以其耗时短,操作简便等特点可以作为标准方法的重要补充,其原理为在酶标板微孔条上预包被叶酸抗原,待测样本或标准品中游离的叶酸与包被在微孔板上的叶酸竞争抗叶酸抗体的抗原结合位点,经洗液洗板后,将未能结合于微孔板上物质除去。然后加入辣根过氧化物酶标记二抗,与叶酸抗体相结合,经 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)底物显色,样本吸光值与其含有的叶酸呈负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中叶酸的含量。

本研究利用不确定度比对不同快速检测方法,以期为非标准快速检测方法的应用提供参考依据,并根据不确定度结果为未来快速方法质控图的制定提供标准依据,探索未来快速方法的优化方向、还可以为后续公司含叶酸产品的研发升级提供检测技术保障。

2 材料与方 法

2.1 试剂与材料

婴幼儿奶粉(叶酸浓度 $\geq 100 \mu\text{g}/100 \text{g}$),女士多维高钙高铁奶粉(简称“女士奶粉”)(叶酸浓度 $\geq 312 \mu\text{g}/100 \text{g}$ (欧世蒙牛公司))。

进口微生物法检测试剂盒;国产微生物法检测试剂盒;进口叶酸酶联免疫法检测试剂盒;国产叶酸酶联免疫法检测试剂盒。

2.2 仪器与设备

ELx808IU 酶标仪、ELX508 洗板机(美国 BioTek 公司); VS-1300L-U 超净工作台(中国苏净集团); 2000237 电热恒温培养箱(西班牙 J.P.Selecta 公司); HV-110 灭菌器(日本 HIRAYAMA 公司); W20M-2 恒温水箱(美国 shellab 公司)。

2.3 样品前处理

微生物法(进口):取 1.0 g 样品至 50 mL 离心管中,准确加入蒸馏水或纯水 40 mL,漩涡混匀。在超净台中用无菌滤膜过滤至无菌离心管中进行检测。

微生物法(国产):称取 1 g(精确至 0.01 g)乳粉样品于离心管中,加入样品处理液 20 mL,混匀,95 °C 水浴加热提取 30 min,其间应至少振荡混合 5 次,然后迅速置于冰水中冷却至 30 °C 以下;在超净工作台内将冷却后的提取液用滤膜过滤至无菌离心管中待测。

酶联免疫法(国产):称取 0.5 g 样品,加入 5 mL 水溶解;取 100 μL 上述样品,加入 900 μL 样本稀释液,振荡混匀,取 70 μL 进行分析。

酶联免疫法(进口):取 10.0 g 奶粉溶于 25 mL PBS 中,定容至 50 mL;混匀后,在沸水中隔水加热 3 min,随后冷却至室温(20~25 °C);3000 g 离心 10 min,弃除上层脂肪,取下层,用样品稀释液 5 倍稀释,待测。

2.4 测定方法

2.4.1 微生物法

(1) 标准曲线的绘制:无菌操作用无菌水复溶标准品,取 6 个无菌离心管按照试剂盒操作要求梯度稀释获得各浓度标准品溶液,用试剂盒进行检测,将各标准品吸光度值代入专业分析软件,利用 4-Parameter Curve 拟合获得标准曲线。

(2) 样品测定:根据样品浓度范围选择适当稀释倍数,使得稀释后样品浓度处于曲线第 2-3 标准品浓度范围内,用试剂盒检测,吸光值代入标准曲线获得浓度值,乘以稀释倍数即为最终样品结果。

2.4.2 酶联免疫法

(1) 标准曲线的绘制:试剂盒自带标准品用试剂盒进行检测,将各标准品吸光度值代入专业分析软件,利用 spline 或者 4-parameters 函数拟合获得标准曲线。

(2) 样品测定:根据样品浓度范围选择适当稀释倍数,使得稀释后样品浓度处于曲线第 2~3 标准品浓度范围内,用试剂盒检测,吸光值代入标准曲线获得浓度值,乘以稀释倍数即为最终样品结果。

2.5 不确定度评价

不同实验人员利用各检测方法,分别对各样品进行 3 d 三平行检测,评估方法的相对不确定度^[15]。

$$\sqrt{SS_t} = 3 \sum_{i=1}^3 (\bar{x}_i - \bar{x} \cdots)^2,$$

$$\sqrt{SS_e} = \sqrt{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2},$$

$$\sqrt{SS_T} = \sqrt{SS_t + SS_e},$$

$$\sqrt{S^2IF} = \sqrt{\frac{SS_t}{6} + \frac{SS_e}{6}},$$

$$\sqrt{CV} = 2S_r = 2 \times \sqrt{S^2IF} \div \bar{X},$$

$$U = \sqrt{2 \times CV}.$$

式中, SS_t 为组间偏差平方和, SS_e 为组内偏差平方和, SS_T 为总偏差平方和, i 代表天数, j 代表重复数, 为 3 天三平行的

均值, S^2IF 为组内与组间均方和, CV 为相对标准偏差, U 为不确定度。

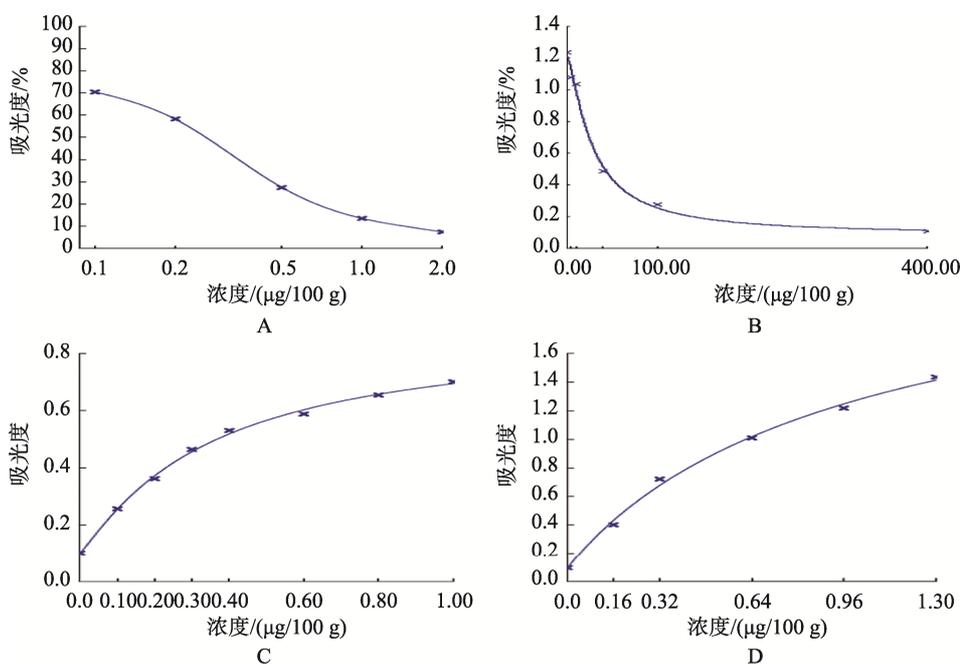
3 结果与分析

3.1 标准曲线

利用专业计算软件, 拟合曲线如下:

3.2 检测结果及正态分布分析

同一试验人员分别使用 4 种方法 3 d 3 平行检测样品, 结果如表 1 所示。



注: A: 国产酶联免疫试剂盒, B: 进口酶联免疫试剂盒, C: 国产微生物检测试剂盒, D: 进口微生物检测试剂盒标准曲线

图1 标准曲线

Fig.1 Standard curve

表 1 不同方法三天三平行检测叶酸样品结果

Table 1 Results of folic acid samples determined by different methods triplicate each day in three days

基质	检测方法	理论浓度 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	第一天			第二天			第三天			正态分布分析 (AD 值)
			检测结果 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)									
			重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	
婴幼儿奶粉	微生物法(进口)	≥ 100	137.60	141.60	129.80	148.80	156.40	143.20	161.60	152.00	147.20	0.101
	微生物法(国产)		175.20	164.80	173.60	177.60	152.80	151.20	139.20	159.20	174.40	0.385
	酶联免疫法(进口)		172.4	187.4	181.9	155.5	137.5	176.1	137.9	152.3	180.9	0.438
	酶联免疫法(国产)		162.80	165.80	168.90	174.80	180.60	172.80	148.90	164.40	154.00	0.221
女士奶粉	微生物法(进口)	≥ 312	418.00	429.00	399.00	498.00	443.00	442.00	458.00	390.00	446.00	0.238
	微生物法(国产)		480.00	510.00	570.00	435.00	432.00	414.00	426.00	426.00	393.00	0.617
	酶联免疫法(进口)		342.0	272.0	283.6	356.5	417.7	403.6	333.4	388.8	330.9	0.232
	酶联免疫法(国产)		468.30	443.40	451.30	481.10	456.30	438.80	503.20	488.90	463.00	0.260

从表 1 可以看出: 采用 Minitab 软件对各试剂检测结果进行正态性检验分析可知, AD 值均小于临界值 0.725(95%置信区间), 各系统均服从正态分布, 数据处于统计受控状态。

进口酶联免疫试剂盒检测女士奶粉中叶酸含量, 第 1 的有 2 个结果未能达到预期, 检测值分别为 272.0、283.6 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 低于理论浓度范围 $\geq 312\ \mu\text{g}/100\text{g}$; 其余试剂都可以满足检测预期(符合理论浓度范围)。

3.3 方法不确定度评估

不确定度检测结果如表 2 所示。

从表 2 可知, 微生物快速检测方法的不确定度范围为 13.3%~27.4%; 酶联免疫方法不确定度范围为 9.6%~31.3%,

二者无明显差异。微生物法检测叶酸, 进口试剂的重复性相对标准偏差(CV_r)、重现性相对标准偏差(CV_R)、以及相对不确定度比国产试剂更低, 结果精密度更好; 而酶联免疫方法则是国产试剂精密度相对更好, 造成这种差异的主要原因是, 不确定较大的检测方法往往有着相对更复杂的样品处理或操作步骤。微生物检测法方面主要体现在国产试剂样品前处理需要进行水浴提取, 进口试剂直接溶解混匀即可; 此外, 国产试剂使用微生物需要培养基复溶混匀后加入微孔, 进口试剂为预先包被于微孔底部。酶联免疫检测法方面, 进口试剂相对于国产试剂增加了水浴加热, 迅速冷却、离心等前处理步骤。增加的操作可能会引入新的不确定度来源, 导致结果重复性、重现性及不确定度的差异。

表 2 不同方法叶酸样品检测不确定度
Table 2 Uncertainty of different methods for the detection of folic acid samples

检测方法	基质	平均值/ $(\mu\text{g}/100\text{g})$	sr	sR	$CV_r/\%$	$CV_R/\%$	绝对不确定度	相对不确定度/ $\%$
婴幼儿奶粉	微生物法(进口)	146.47	6.67	10.54	4.60	7.20	21.07	14.40
	微生物法(国产)	165.89	5.42	11.07	3.30	6.70	22.15	13.30
	酶联免疫法(进口)	164.66	17.41	19.8	10.60	12.00	39.6	24.10
	酶联免疫法(国产)	163.11	13.69	13.69	8.40	8.40	27.38	16.80
女士奶粉	微生物法(进口)	435.89	29.3	33.3	6.70	7.60	66.61	15.30
	微生物法(国产)	454	29.39	62.28	6.50	13.70	124.56	27.40
	酶联免疫法(进口)	347.61	34.19	54.49	9.80	15.70	108.97	31.30
	酶联免疫法(国产)	466.03	18.52	22.46	4.00	4.80	44.91	9.60

4 结 论

通过不同原理快速检测方法的比对可以看出二者均可以应用于乳粉中叶酸含量的检测。其中, 微生物试剂盒快速检测方法, 具有稳定性较好, 品牌差异较小的特点, 适合质控品的长期检测, 质控图的建立; 而酶联免疫检测方法, 具有简单、快速的特点, 更适合样品中叶酸的快速筛查。

本实验应用整体法评价不确定度, 以影响分析测试程序的所有变量为基础评估不确定度。其优势在于简单易行, 全面监控所有变量对不确定度的影响。可以通过和相关不确定度标准比较, 制定符合实验室自身状况的不确定度要求, 应用于日常质量控制(例如: 法国 Bipea 能力验证提供机构推荐快速筛选方法不确定度为 30%, 实验室可选择表 2 中不确定度更低的进口微生物法检测试剂或者国产酶联免疫检测试剂, 并将不确定度定为 20%进行日常质量控制)。其不足之处在于未能充分考虑偏倚(乳粉中叶酸含量真值不易获得, 本次评价未予考虑), 因此在采取整体法进行方法不确定评价前, 还可以通过和国家标准方法

进行比对, 从而充分评价偏倚对检测结果的影响, 以期在准确度及稳定性方面全面评价检测方法。

参考文献

- [1] Kong Dh, Liu LQ, Song SS, *et al.* Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of folic acid in energy drinks and milk samples [J]. Food Agric Immunol, 2016, (1): 1-14.
- [2] Donnelly JG. Folic acid [J]. Crit Rev Cl Lab Sci, 2001, (38): 183-223.
- [3] Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism [J]. Vitam Horm, 2008, (79): 1-44.
- [4] Blencowe H, Cousens S, Modell B, *et al.* Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders [J]. Int J Epidemiol, 2010, 39(Suppl 1): 110-121.
- [5] Schorah CJ. Folic acid food fortification to prevent neural tube defects [J]. Lancet, 1998, 351(9105): 834.
- [6] Barco TB, Finocchio SAMN, Lima JC, *et al.* Knowledge of supplemental folic acid during pregnancy [J]. Invest Ed Enferm, 2015, 33(3): 12-18.
- [7] Leuckx S. Pregnancy wish and folic acid supplements [J]. J Pharm Belgiq, 2015, (4): 4.
- [8] Gambling L, Dunford S, Mcardle HJ. Iron deficiency in the pregnant rat has differential effects on maternal and fetal copper levels [J]. J Nutr

- Biochem, 2004, 15(6): 366–372.
- [9] WS/T 600-2018 人群叶酸缺乏筛查方法[S].
WS/T 600 Screening methods for folate deficiency in 2018 [S].
- [10] GB 15770-2010 食品安全国家标准 食品添加剂 叶酸[S].
GB 15770-2010 National food safety standard-Food additive-folic acid [S].
- [11] Gill BD, Saldo S, Wood JE, *et al.* A rapid method for the determination of biotin and folic acid in liquid milk, milk powders, infant formula, and milk-based nutritional products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(5): 1578–1583.
- [12] 李江, 严家俊, 綦艳, 等. 酶联免疫法快速检测奶粉中的叶酸[J]. *中国乳品工业*, 2017, (10): 37–38, 50.
Li J, Yan JJ, Qi Y, *et al.* Rapid detection of folic acid in milk powder by enzyme linked immunosorbent assay [J]. *Chin Dair Ind*, 2017, (10): 37–38, 50.
- [13] Liang ZP, Ha WZ, Xiao ZL, *et al.* Development of a simple, fast, and quantitative lateral flow immunochromatographic strip for folic acid [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10(7): 2444–2453.
- [14] GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定[S].
GB 5009.211-2014 National food safety standard-Determination of folic acid in foods [S].
- [15] 胡静, 林立民, 宋晓东, 等. 利用不确定度质控图进行实验室内部质量控制[J]. *粮食与饲料工业*, 2018, (7): 61–63.
Hu J, Lin LM, Song XD, *et al.* Uncertainty control chart for laboratory internal quality control [J]. *Cereal Feed Ind*, 2018, (7): 61–63.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



解 鑫, 硕士, 工程师, 食品检测及分析。
E-mail: xiexin@mengniu.cn

宋晓东, 硕士, 高级工程师, 实验室及
质量技术管理。

E-mail: songxiaodong@mengniu.cn