

微生物法测定全营养配方食品中生物素的不确定度评定

曹艳娟*, 蔡伟江, 蔡晓霞

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: 目的 评定微生物法测定全营养配方食品中生物素的不确定度。**方法** 依据 GB 5009.259-2016《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》以及相关统计学方法,对影响全营养配方食品中生物素含量结果的不确定度分量进行探究和评定。**结果** 生物素含量的扩展不确定度为 $1.84 \mu\text{g}/100 \text{g}$, $k=2$ 。通过研究发现测量重复性和标准物质称量及标准溶液配制过程是影响检测结果的主要因素,试样系列管制备过程、标准曲线拟合、紫外分光光度计的偏差和样液制备过程为次要因素。

结论 该方法灵敏度高,准确度好,对全营养配方食品中生物素测定结果的不确定度作出较好评估。

关键词: 全营养配方食品;微生物法;生物素;不确定度;非线性曲线拟合

Uncertainty evaluation for the determination of biotin in nutritionally complete food by microbial method

CAO Yan-Juan*, CAI Wei-Jiang, CAI Xiao-Xia

(By-Health Co.,Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty for determination of biotin in nutritionally complete food by microbiological method. **Methods** According to GB 5009.259-2016 *National food safety standard-Determination of biotin in foods* and JJF 1059.1-2012 *Evaluation and representation of measurement uncertainty* and relevant statistical methods, the uncertainty components affecting biotin content results in nutritionally complete food were explored and evaluated. **Results** The extended uncertainty of biotin content was $1.84 \mu\text{g}/100 \text{g}$, $k=2$. It was found that the repeatability of measurement, the weight of standard substance and the preparation process of standard solution were the main factors affecting the test results. Sample series control preparation process, standard curve fitting, deviation of UV spectrophotometer and sample preparation process were secondary factors. **Conclusion** This method had high sensitivity and good accuracy, and can be used to evaluate the uncertainty of biotin determination results in whole-nutrition formula food.

KEY WORDS: nutritionally complete food; microbial method; biotin; uncertainty; nonlinear curve fitting

1 引言

全营养配方食品是可作为单一营养来源满足目标人

群营养需求的特殊医学用途配方食品,即可作为单一营养来源满足进食受限、消化吸收障碍、代谢紊乱或特定疾病状态人群(有此类食品需求但对营养素没有特别限制的人

*通讯作者: 曹艳娟, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: Janie_Cho@163.com

*Corresponding author: CAO Yan-Juan, By-Health Co., Ltd. No.70, Sanzao Technology Industrial Park, Jinwan District, Zhuhai 519040, China. E-mail: Janie_Cho@163.com

群)对营养素或膳食的特殊需要,专门加工配制而成的配方食品^[1]。其不仅能提高疾病的治疗效果和术后康复效果、改善患者营养状况,还能增强机体自身抵抗力,在提高患者整体健康水平等方面具有良好效果^[2]。生物素又称维生素 H、维生素 B₇,是一种动物机体内维持正常生理机能所必需的水溶性 B 族维生素之一^[3],参与体内代谢过程,易被机体消耗,不能在体内贮存或贮存量很少,需每天补充^[4]。在国家标准中规定,全营养配方食品的生物素含量具有严格限量,含量较低,因此对全营养配方食品中生物素等维生素添加量的监控尤为重要。目前生物素的测定方法有很多,因微生物法灵敏度良好,相较于检出限较高的气相色谱法和高效液相法应用更为广泛,是唯一被国际官方组织确认和引用的方法,目前也被纳入国家标准检验方法的仲裁法中^[5-7]。微生物法操作过程的复杂繁琐度、人员操作的重复性是否一致、仪器设备的性能是否达标、菌株生长受其他营养物质影响的生长不确定性、受植物乳杆菌生长曲线影响的非线性曲线拟合等均对检测结果有较大影响,检测结果的分散性较大。为保证生物素测定结果的准确性,本研究依据 GB 5009.259-2016《食品安全国家标准食品中生物素的测定》^[8]和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[9]以及相关统计学方法,对影响全营养配方食品中生物素含量结果的不确定度分量进行探究和评定,并给出扩展不确定度,为评价微生物法测定全营养配方食品中生物素含量的准确度和精密度提供依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

AL204 分析天平、XP205 分析天平(美国 METTLER TOLEDO 公司);LT602E 电子天平(常熟市天量仪器有限公司);BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);BSC-1600-II-A2 生物安全柜(苏州市华宇净化设备有限公司);UV-2600 紫外分光光度计(日本岛津仪器有限公司);SPX-250BSH-II 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);F202A075 漩涡振荡器(意大利 VELP 公司)。

无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、硫酸(分析纯,广州化学试剂厂);生物素化学对照品,纯度为 99.5%(中国食品药品检定研究院);实验样品:全营养配方食品(汤臣倍健股份有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 试样称量和水解

准确称取 6 份同一批次样品,精确至 0.0001 g,于 250 mL 三角瓶中,加入 3%硫酸溶液 100 mL,121 °C 水解 30 min,冷却后用水定容至 250 mL 容量瓶中充分混合。离心后过滤,吸取 4.0 mL 上清液加水 20.0~30.0 mL,用氢氧

化钠溶液调 pH 为 6.8±0.2,定量转到 100 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀。

2.2.2 系列管操作

试样系列管:取 4 支试管,分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0 mL 试样提取液,补水至 5.0 mL,加入 5.0 mL 生物素测定用培养基,混匀,每梯度做 3 个平行。

标准系列管:取试管分别加入 0.0 mL(空白)、0.0 mL(空白+菌液)、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 mL 标准曲线工作液,补水至 5.0 mL,加入 5.0 mL 生物素测定用培养基,混匀,每梯度做 3 个平行。

2.2.3 培养条件

所有试管盖上试管塞,121 °C 灭菌 5 min 后,快速冷却至室温,在洁净区的生物安全柜进行加菌,每支试管接 50 μL,标准空白系列管除外,置于(37±1) °C 生化培养箱培养 22 h。

2.2.4 测定和报告

培养好的测定管用漩涡振荡器振匀,在 550 nm 下,空白加菌液管调零,进行吸光度(absorbance, A)测定,根据标准系列管的生物素含量和测定的吸光值拟合标准曲线,根据样品的吸光值,计算样品的生物素含量并报告^[8]。

3 结果与分析

3.1 不确定度的来源识别

根据 GB 5009.259-2016^[8]对样品的生物素含量进行测定,分析检测流程图和生物素检测计算公式,识别该方法的不确定度来源并评定^[8-10],见公式 1 和图 1。

生物素含量的计算公式为:

$$X = \frac{\bar{c} \times f}{m} \times \frac{100}{1000} \quad (1)$$

其中:

X —试样中生物素含量, μg/100 g;

\bar{c} —待测液中生物素总平均浓度, ng/mL;

m —试样的质量, g;

f —稀释倍数。

$\frac{100}{1000}$ —由纳克每克(ng/g)换算为微克每百克(μg/

100 g)的系数。

从检测流程图和生物素检测计算公式分析可知,影响待测液生物素总平均浓度不确定度的因素主要是样品测量重复性、标准物质称量及标准溶液配制过程、紫外分光光度计测量偏差和标准曲线拟合等。影响试样质量的因素主要是电子天平的误差等,影响稀释倍数的因素主要是测量重复性、样液稀释、温度变化和试样系列管的加入等。根据 CNAS-GL 006: 2019^[11],重复性评估作为整体可在方法确认研究中得到,因此该检测过程涉及的重复性分量组合为一种分量,即样品测量重

复性^[11], 本研究评估的不确定指由测量重复性、标准物质称量及标准溶液配制、电子天平误差、样液稀释过程、试样系列管制备、紫外分光光度计测量偏差和标准曲线拟合造成的不确定度^[12,13]。

3.2 不确定度分量的评定

3.2.1 测量重复性引入的不确定度

根据实验方法对定值样品的生物素含量进行 6 次平行测定, 结果见表 1, 重复测量产生的不确定度属于 A 类不确定度^[14]。

根据极差法评定计算单个测得值的实验标准差 S , 见式(2):

$$S = \frac{R}{C} = 1.0040 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad (2)$$

其中:

R —极差;

C —极差系数。

实验室通常做 2 次平行实验($n=2$), 被测量估计值的标准不确定度见式(3):

$$u(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} = 0.7099 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad (3)$$

检测结果取平均值 \bar{x} , 相对标准不确定度见式(4):

$$u_{\text{rel}}(\bar{x}) = \frac{u(\bar{x})}{\bar{x}} = 0.028579 \quad (4)$$

3.2.2 标准物质称量及标准溶液引入的不确定度

标准物质称量及标准溶液的不确定度影响因素主要有标准物质的纯度、标准品的称量和标准溶液的配制。标准物质的纯度为 99.5%, 在配制标准溶液时, 会根据纯度进行折算, 因此标准品纯度不予考虑。

(1) 标准品的称量引入的不确定度

准确称量生物素标准品 12.6492 mg, 根据分析天平的校准证书, 采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 标准品的称量引入的相对标准不确定度见表 2。

标准品的称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_{\text{标}})$ 为 0.002282。

(2) 标准溶液配制引入的不确定度

标准溶液配制过程中使用 100 mL 的容量瓶、1 mL 移液枪, 其中从标准储备液到标准中间液, 再到标准工作液, 最后到标准曲线工作液, 容量瓶共使用 4 次, 1 mL 移液枪吸取 0.9、1.0 mL 溶液, 5 mL 移液枪吸取 2.0 mL 溶液。采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 量具引入的相对标准不确定度见表 3。

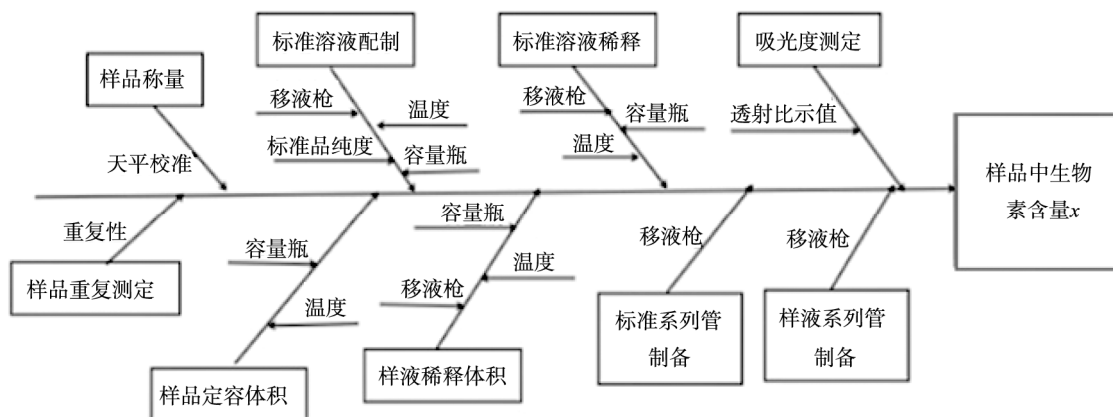


图 1 生物素检测流程

Fig.1 Biotin detection process

表 1 样品中生物素含量的测定结果

Table 1 Determination of biotin content in the sample

测定次数	1	2	3	4	5	6	均值
含量/($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)	24.61	23.40	24.70	25.00	25.42	25.94	24.84

表 2 标准品的称量引入的不确定度

Table 2 The uncertainty introduced by the weighting of a standard substance

天平	最大允许误差/g	标准不确定度/g	相对标准不确定度
示值误差	± 0.0005	2.887×10^{-5}	2.887×10^{-5}

合成标准溶液配制过程量具引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$ 为:

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_{c1})^2 + u_{\text{rel}}(V_{c2})^2 + u_{\text{rel}}(V_{c3})^2} = 0.011672。$$

其中:

$u_{\text{rel}}(V_{c1})$ —标准溶液配制过程 100 mL 容量瓶引入的不确定度;

$u_{\text{rel}}(V_{c2})$ —标准溶液配制过程 1 mL 移液枪引入的不确定度;

$u_{\text{rel}}(V_{c3})$ —标准溶液配制过程 5 mL 移液枪引入的不确定度。

由于本实验室温度在 (20 ± 5) °C 的范围内波动, 假设温度变化为 5 °C, 该温度引起的不确定度可通过估算温度范围和体积膨胀系数计算, 液体的体积膨胀 V_T 明显大于容量瓶的体积膨胀。采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 水的膨胀系数为 0.00021 °C, 温度产生的不确定度为:

$$U(V_T) = \frac{V_T \times 0.00021 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.0006062 V_T。$$

温度产生的相对标准不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(V_T) = \frac{U(V_T)}{V_T} = 0.0006062。$$

标准溶液配制引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{标}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V)^2 + u_{\text{rel}}(V_T)^2} = 0.011688。$$

(3) 标准系列管制备引入的不确定度

标准系列管加入过程中使用了 1 mL 移液枪吸取 0.5、1.0 mL, 使用 10 mL 移液枪吸取 1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 mL。系列管做 3 个平行, 采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 每个吸取标准溶液体积的移液枪不确定度见表 4。

标准系列管制备引入的合成相对标准不确定度, 其中 $u_{\text{rel}}(Q_i)$ 为移液枪吸取各标准溶液体积的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(Q) = \sqrt{\sum_{i=1}^8 (u_{\text{rel}}(Q_i))^2} = 0.013238。$$

标准物质称量及标准溶液引入的不确定度(分量)合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(B) = \sqrt{u_{\text{rel}}(m_{\text{标}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{标}})^2 + u_{\text{rel}}(Q)^2} = 0.017806。$$

3.2.3 天平误差引入的不确定度

天平误差会影响样品的质量, 进而影响实验结果, 用分析天平准确称量生物素样品 7.5052 g, 实验室做 2 次样品平行, 称量 2 次, 采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 天平示值和偏载率的不确定度见表 5。

表 3 标准溶液配制过程量具引入的不确定度

Table 3 Uncertainty introduced by gauge for standard solution preparation process

量具	最大容量允许误差/mL	标准不确定度/mL	相对标准不确定度
100 mL 容量瓶	±0.1000	5.774×10^{-2}	1.1550×10^{-3}
1 mL 移液枪	±0.0100	5.774×10^{-3}	1.1040×10^{-2}
5 mL 移液枪	±0.0125	7.217×10^{-3}	3.6080×10^{-3}

表 4 吸取标准溶液体积的移液枪引入的不确定度

Table 4 Uncertainty of pipette introduction for absorbing standard solution volume

吸取标准溶液体积/mL	最大容量误差/mL	标准不确定度/mL	相对标准不确定度
0.5	±0.0050	2.887×10^{-3}	5.774×10^{-3}
1.0	±0.0100	5.774×10^{-3}	5.774×10^{-3}
1.5	±0.0125	7.217×10^{-3}	4.811×10^{-3}
2.0	±0.0125	7.217×10^{-3}	3.608×10^{-3}
2.5	±0.0125	7.217×10^{-3}	2.887×10^{-3}
3.0	±0.0300	1.732×10^{-2}	5.774×10^{-3}
4.0	±0.0300	1.732×10^{-2}	4.330×10^{-3}
5.0	±0.0300	1.732×10^{-2}	3.464×10^{-3}

表 5 天平误差引入的不确定度

Table 5 Uncertainty introduced by the balance error

天平	最大允许误差/g	标准不确定度/g	相对标准不确定度
示值	±0.0005	2.887×10^{-5}	3.846×10^{-6}
偏载率	±0.0010	5.773×10^{-4}	7.693×10^{-5}

天平误差引入的合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(Q) = \sqrt{u_{\text{rel}}(Q_1)^2 + u_{\text{rel}}(Q_2)^2} = 0.00007702$$

其中:

$u_{\text{rel}}(Q_1)$ —天平示值的不确定度;

$u_{\text{rel}}(Q_2)$ —天平偏载率的不确定度。

3.2.4 样液制备过程引入的不确定度

样液制备过程中使用 250、100 mL 的容量瓶、5 mL 移液枪, 用移液枪吸取 2.5 mL, 本实验室温度在 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 的范围内波动, 假设温度变化为 5°C , 该温度引起的不确定度可通过估算温度范围和体积膨胀系数计算, 液体的体积膨胀明显大于容量瓶的体积膨胀。采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 样液制备过程引入的相对标准不确定度见表 6。

样液制备过程引入的合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(Y) = \sqrt{u_{\text{rel}}(Y_1)^2 + u_{\text{rel}}(Y_2)^2 + u_{\text{rel}}(Y_3)^2 + u_{\text{rel}}(V_T)^2} = 0.003085。$$

其中:

$u_{\text{rel}}(Y_1)$ —250 mL 容量瓶引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}}(Y_2)$ —100 mL 容量瓶引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}}(Y_3)$ —5 mL 移液枪引入的相对标准不确定度。

3.2.5 试样系列管制备引入的不确定度

试样系列管制备过程中使用了 5 mL 移液枪吸取 1.0、2.0、3.0、4.0 mL 共 4 个梯度。每个系列管做 3 个平行, 采用矩形分布, 包含因子为 $\sqrt{3}$, 每个吸取标准溶液体积的移液枪不确定度见表 7。

试样系列管制备过程引入的合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(S) = \sqrt{u_{\text{rel}}(S_1)^2 + u_{\text{rel}}(S_2)^2 + u_{\text{rel}}(S_3)^2 + u_{\text{rel}}(S_4)^2} = 0.010825。$$

其中:

$u_{\text{rel}}(S_1)$ —移液枪吸取 1.0 mL 引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}}(S_2)$ —移液枪吸取 2.0 mL 引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}}(S_3)$ —移液枪吸取 3.0 mL 引入的相对标准不确定度;

$u_{\text{rel}}(S_4)$ —移液枪吸取 4.0 mL 引入的相对标准不确定度。

3.2.6 紫外分光光度计测量偏差引入的不确定度

紫外分光光度计测试吸光度主要的不确定度为透射比示值误差, 由紫外分光光度计的校准报告可知, 透射比的最大允许误差 a_3 为 1.00%, 采用矩形分布, 包含因子 k 为 $\sqrt{3}$, 紫外分光光度计的标准不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(Z) = \frac{a_3}{k} = 0.005773。$$

3.2.7 标准曲线的拟合引入的不确定度

样品的含量浓度随标准曲线的变化而变化, 按照国标, 标准系列管做 8 个浓度梯度, 每个浓度梯度做 3 次平行, 参考占永革等^[15]的《化学分析中非线性曲线拟合结果的不确定度评定》, 采用乘幂线性化法将标准曲线线性化, 用线性公式计算非线性曲线拟合结果的不确定度, 测得实验数据见表 8。

表 6 样液制备过程引入的不确定度
Table 6 Uncertainty introduced in the preparation of sample solution

量具	最大容量误差/mL	标准不确定度/mL	相对标准不确定度
250 mL 容量瓶	± 0.3000	1.732×10^{-1}	6.928×10^{-4}
100 mL 容量瓶	± 0.1000	5.773×10^{-2}	5.773×10^{-4}
5 mL 移液枪	± 0.0125	7.217×10^{-3}	2.887×10^{-3}
温度	$\pm 1.05 \times 10^{-3} V_T$	$6.062 \times 10^{-4} V_T$	6.062×10^{-4}

表 7 天平误差引入的不确定度
Table 7 Uncertainty introduced by the balance error

吸取体积/mL	最大容量误差/mL	标准不确定度/mL	相对标准不确定度
1.0	± 0.0125	7.217×10^{-3}	7.217×10^{-3}
2.0	± 0.0125	7.217×10^{-3}	7.217×10^{-3}
3.0	± 0.0300	1.732×10^{-2}	5.774×10^{-3}
4.0	± 0.0300	1.732×10^{-2}	4.330×10^{-3}

表 8 生物素标准曲线实验数据
Table 8 Biotin standard curve experimental data

生物素浓度/(ng/mL)		吸光度值	
0.1139	0.2469	0.2401	0.2370
0.2277	0.5318	0.5326	0.4950
0.3416	0.7425	0.7688	0.7558
0.4554	0.9988	0.9869	1.0224
0.5693	1.2183	1.1895	1.1735
0.6831	1.4121	1.3625	1.3464
0.9108	1.7011	1.6400	-
1.1385	1.8658	1.8302	1.8352

注: $Y = -110195 X^3 - 0.735432 X^2 + 2.64349 X - 0.0491131$, 转化为线性方程: $Y = 2.87X - 0.2896$, $b = 2.87$ 。

根据标准曲线实验数据表, 曲线的剩余标准差 S_R :

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = 0.01860 \text{ ng/mL}.$$

其中:

- y_i : 绘制标准溶液时各点的浓度配制值;
- \hat{y}_i : 从标准曲线查出的浓度值;
- n : 绘制标准曲线的测量点数量。

试样系列管做 4 个浓度梯度, 每个点做 3 个平行, 测得各管吸光度, 依据标准曲线测得的试样系列管中生物素的吸光度值, 见表 9。

表 9 试样系列管中生物素的吸光度值
Table 9 The absorbance of biotin in a series of tubes

试样系列管梯度/mL	生物素的吸光度值		
1	0.4110	0.4112	0.4112
2	0.8217	0.8217	0.8217
3	1.1638	1.1638	1.1637
4	1.5074	1.5078	1.5078

标准曲线拟合引入的标准不确定度为:

$$u(\bar{y}_0) = \frac{S_R}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x}_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 0.004005 \text{ ng/mL}.$$

其中:

- \bar{x}_0 : 试样系列管生物素的吸光度值;
- \bar{x} : 绘制标准曲线时各点吸光度的平均值;
- x_i : 绘制标准曲线时由对应浓度点产生的吸光度值;
- p : 试样系列管测定次数;

- n : 绘制标准曲线的吸光度点数;
 - k : 决定吸光度最佳变化幅度的幂指数, 为 1.73。
- 标准曲线拟合的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\bar{y}_0) = \frac{u(\bar{y}_0)}{\bar{y}_0} = 0.008527.$$

其中:

- \bar{y}_0 : 试样系列管中生物素浓度的平均值 0.4697 ng/mL。

3.3 合成不确定度和扩展不确定度

本研究的不确定度主要有以下 4 个, 见表 10。

表 10 不确定度(分量)的结果
Table 10 The result of uncertainty (component)

方法的不确定度来源	相对标准不确定度
测量重复性	2.8579×10^{-2}
标准物质称量及标准溶液	1.7806×10^{-2}
天平的误差	7.7020×10^{-3}
样液制备过程	3.8050×10^{-3}
试样系列管制备	1.0825×10^{-2}
紫外分光光度计测量偏差	5.773×10^{-3}
标准曲线的拟合	8.5270×10^{-3}

本方法的合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}(\bar{x})^2 + U_{\text{rel}}(B)^2 + u_{\text{rel}}(Q)^2 + u_{\text{rel}}(Y)^2 + u_{\text{rel}}(S)^2 + u_{\text{rel}}(Z)^2 + u_{\text{rel}}(\bar{y}_0)^2} = 0.036967.$$

合成标准不确定度为:

$$u = \bar{x} \times u_{\text{rel}}(X) = 0.9183 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

扩展不确定度由合成标准不确定度乘包含因子 k , $k=2$:

$$U=u \times k = 1.84 \mu\text{g}/100 \text{g}$$

4 结 论

本研究采用微生物法对全营养配方食品中的生物素进行测定,测得全营养配方食品的生物素含量 $m=(24.84 \pm 1.84) \mu\text{g}/100 \text{g}$, $k=2^{[9]}$ 。通过不确定度分量的研究和计算结果对比发现,影响全营养配方食品生物素含量的主要因素是测量重复性和标准物质称量及标液配制过程,其他因素为试样系列管制备过程、标准曲线拟合、紫外分光光度计的偏差和样液制备过程,天平的称量误差对不确定度的影响不显著。测量重复性和标准物质称量及标液配制都与质控程序密切相关,对于购买标准品、标准菌株和培养基等进行严格监控,测量仪器需定期校准,严格按照实验操作规范操作,尽量保持实验的一致性,如所用的试管清洗干净后高温 $180 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干 2 h 以上,以除去玻璃器具上残留的水溶性维生素,最大程度减少非微生物因素的影响,接种液制备成甘油菌液采用超低温冻存,有效期可达 8 个月,保证植物乳杆菌的活力特性保持一致,同时植物乳杆菌的培养条件需严格把控,来减少植物乳杆菌生长浊度对检测含量结果的影响。微生物生长一般经历延缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期 4 个生长时期^[16],因微生物的生长特性,通常测定的生物素样品标准曲线并非是一次线性方程,采用了乘幂线性化法对生物素标准曲线进行转化,计算非线性曲线拟合结果的不确定度^[15],避免直接用线性曲线公式计算非线性曲线而导致剩余标准差偏大的现象。因此,整个生物素的含量测定过程,环环相扣,每个环节都需严格把控,保证实验操作的严谨性和一致性,从而提高生物素含量检测的准确度和精密度。

参 考 文 献

- [1] GB 29922-2013 食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则[S]. GB 29922-2013 National food safety standard-General rules for formula foods for special medical purposes [S].
- [2] 孙玉凤,范蓓,王艳,等. 特殊医学用途配方食品研究进展与展望[J]. 生物产业技术, 2017, (4): 70-75.
Sun YF, Fan B, Wang Y, *et al.* Research progress and prospect of formula food for special medical use [J]. Biotechnol Bus, 2017, (4): 70-75.
- [3] 潘林,孙建义. 生物素的生理功能及其分子作用机制[J]. 中国饲料, 2005, (6): 21-24.
Pan L, Sun JY. Physiological function and molecular mechanism of biotin [J]. China Feed, 2005, (6): 21-24.
- [4] 李全霞,崔亚娟,赵寅菲,等. 微生物法测定食品中水溶性维生素的原理及进展[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 338-344.
Li QX, Cui YJ, Zhao YF, *et al.* Principle and progress of microbiological assay for water-soluble vitamins in foods [J]. Food Sci, 2013, 34(13): 338-344.
- [5] 王志伟. 婴幼儿乳粉中生物素含量的测定研究[J]. 包装与食品机械, 2013, 31(3): 66-68, 72.
Wang ZW. Research on determination of biotin in infant milk powder [J]. Pack Food Mach, 2013, 31(3): 66-68, 72.
- [6] 熊娟,蔡大川,张燕忠,等. 微生物法测定米粉中维生素 B₆ 含量不确定度评估[J]. 福建农业科技, 2017, (4): 19-22.
Xiong J, Cai DC, Zhang YZ, *et al.* Uncertainty evaluation in determination of vitamin B₆ in rice flour by microbiological method [J]. Fujian Agric Sci Technol, 2017, (4): 19-22.
- [7] 张施敬,李姣,林耀文,等. 微生物法测定婴幼儿乳粉中泛酸质量分数的不确定度评定[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(12): 37-40.
Zhang SJ, Li J, Lin YW, *et al.* Uncertainty evaluation for microbiological determination of pantothenic acid in infant milk powder [J]. China Dairy Ind, 2014, 42(12): 37-40.
- [8] GB 5009.259-2016 食品安全国家标准食品中生物素的测定[S]. GB 5009.259-2016 National food safety standard-Determination of biotin in foods [S].
- [9] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. JJF 1059.1-2012 Evaluation and representation of measurement uncertainty [S].
- [10] 刘杨,顾鑫荣,盛丽霞. 分光光度法测定白酒中的氰化物含量不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(7): 2247-2251.
Liu Y, Gu XR, Sheng LX. Uncertainty evaluation for the determination of cyanide in liquor by spectrophotometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(7): 2247-2251.
- [11] CNAS-GL006:2019 化学分析中不确定度的评估指南[S]. CNAS-GL006:2019 Guidelines for the evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].
- [12] 张艳,霍胜楠,胡明燕,等. 婴幼儿乳粉中泛酸测定的不确定度研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(9): 92-95.
Zhang Y, Huo SN, Hu MY, *et al.* Uncertainty evaluation for pantothenic acid determination in infant formula [J]. Food Res Dev, 2014, 35(9): 92-95.
- [13] 商迎辉,章丽娜,李梦洁,等. 微生物法测定婴幼儿配方食品中生物素的不确定度评估[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 221-226.
Shang YH, Zhang LN, Li MJ, *et al.* Uncertainty evaluation for microbiological assay of biotin in formula [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(10): 221-226.
- [14] JJF 1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S]. JJF 1135-2005 Evaluation of measurement uncertainty in chemical analysis [S].
- [15] 占永革,黄湘燕,龚剑. 化学分析中非线性曲线拟合结果的不确定度

评定[J]. 冶金分析, 2011, 31(8): 26-30.

Zhan YG, Huang XY, Gong J. Evaluation of uncertainty of non-linear curve fitting results in chemical analysis [J]. Metal Anal, 2011, 31(8): 26-30.

[16] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

Shen P, Chen XD. Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



曹艳娟, 初级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: Janie_Cho@163.com



“食品安全快速检测技术”专题征稿函

食品安全快速检测技术是食品安全保障的重要支撑。要从根本上解决食品安全问题, 就必须对食品的生产、加工、流通和销售等各环节实施全程管理和监控, 而实验室检测方法和仪器是很难及时、快速而全面地从各环节监控食品安全状况, 这就需要大量能够满足这一要求的快速、方便、准确、灵敏的食品安全分析检测技术。

本刊特别策划了“食品安全快速检测技术”专题, 由 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 陈爱亮 研究员 担任专题主编, 主要围绕 比色分析技术、光谱分析技术、免疫分析技术、层析检测技术、无损检测技术、生物检测技术、快速前处理技术、电化学传感器、纳米技术”等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可, 本专题计划在 2021 年 1 月出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编 吴永宁 研究员、专题主编 陈爱亮 研究员及编辑部全体成员 特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

请在 **2020 年 11 月 30 日** 前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 食品安全快速检测技术”)

邮箱投稿: E-mail: jfoods@126.com(备注 食品安全快速检测技术 专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部