

# 微生物法测定乳粉中叶酸的不确定度评定

史方<sup>1</sup>, 唐慧骥<sup>2</sup>, 李传民<sup>3</sup>, 张亚斌<sup>3</sup>, 李轲<sup>2\*</sup>

(1. 安阳海关, 安阳 455000; 2. 郑州海关, 郑州 450008;

3. 河南捷信检测认证有限公司, 郑州 450008)

**摘要: 目的** 评定微生物法测定乳粉中叶酸的不确定度。**方法** 按照 GB 5009.211—2014《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》规定的微生物法对婴儿配方乳粉中叶酸含量进行测定, 根据 CNAS-CL01-G003:2019 要求, 依据 GB/Z 22553—2010 和 JJF 1059.1—2012, 分析测定过程中影响检验结果的因素主要包括测量重复性、试样前处理(称量、稀释)、标准物质、标准溶液配制(称量、稀释)、实验温度、拟合标准曲线、紫外分光光度计, 通过对各个不确定度分量进行分析、评估, 计算合成得出被测样品中叶酸含量测量结果的标准不确定度, 得出扩展不确定度。**结果** 经测定, 婴儿配方乳粉中叶酸含量为(80.2±4.28) μg/100 g,  $k=2$ 。**结论** 微生物因素对测量不确定度具有显著影响, 由标准曲线拟合和重复测量体现。

**关键词:** 叶酸; 乳粉; 微生物法; 不确定度

## Uncertainty evaluation for the determination of folic acid in milk powder by microbiological methods

SHI Fang<sup>1</sup>, TANG Hui-Ji<sup>2</sup>, LI Chuan-Min<sup>3</sup>, ZHANG Ya-Bin<sup>3</sup>, LI Ke<sup>2\*</sup>

(1. Anyang Customs, Anyang 455000, China; 2. Zhengzhou Customs, Zhengzhou 450008, China;

3. Henan Jiexin Testing and Certification Co., Ltd., Zhengzhou 450008, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty for the determination of folic acid in milk powder by microbiological methods. **Methods** The folic acid content in infant formula milk powder was determined by microbial method according to GB 5009.211—2014 *National food safety standard-Determination of folic acid in foods*. According to the requirements of CNAS-CL01-G003: 2019, GB/Z 22553—2010 and JJF 1059.1—2012, the factors influencing the test results in the analysis and determination process mainly included measurement repeatability, sample pretreatment (weighing and dilution), reference materials, standard solution preparation (weighing and dilution), experimental temperature, standard curve fitting and UV spectrophotometer, through the analysis and evaluation of each uncertainty component, the standard uncertainty of measurement results of folic acid content in the tested sample was calculated and synthesized, and the expanded uncertainty was obtained. **Results** The content of folic acid in infant formula milk powder was (80.2±4.28) μg/100 g,  $k=2$ . **Conclusion** Microbial factors have significant influence on measurement uncertainty, which is reflected by standard curve fitting and repeated measurement.

**KEY WORDS:** folic acid; milk powder; microbiological method; uncertainty

\*通信作者: 李轲, 高级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: like77312@163.com

\*Corresponding author: LI Ke, Senior Veterinarian, Zhengzhou Customs, No. 269, Jinshui Road, Zhengzhou 450008, China. E-mail: like77312@163.com

## 0 引言

叶酸(folic acid)又名喋酰谷氨酸,广泛地存在于动物性食品、鲜果、蔬菜中,是一种黄色结晶<sup>[1]</sup>,尤以动物肝脏和植物绿叶含量最为丰富。自然界中叶酸有多种存在形式,其母体化合物是由喋啶、谷氨酸和对氨基苯甲酸3种成分结合而成,大多天然存在的叶酸是多谷氨酸形式<sup>[2-5]</sup>。叶酸能促进蛋白质合成及细胞分裂与生长,对正常红细胞的形成也有促进作用<sup>[6-7]</sup>。缺乏时可致红细胞减少生成血红蛋白、阻碍细胞成熟,导致巨幼红细胞性贫血<sup>[8]</sup>。

目前,食品中叶酸含量测定方法主要有微生物法、免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法、共振光散射技术、可见吸收光谱法、微孔板法、液相色谱法、固相萃取-高效液相色谱法、微分脉冲伏安等<sup>[9-11]</sup>。而微生物法不易受样品本身复杂基质的干扰,灵敏度高,一直是美国官方分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)推荐方法,也是欧美、中国等国家的官方认可方法<sup>[12]</sup>。然而微生物生长不确定性强,微生物法操作繁杂,结果不确定因素较多,为提高实验室的测量能力,保证微生物法测定乳粉中叶酸测量结果的可信性、有效性,本研究依据 CANS-GL05: 2011《测量不确定度要求的实施指南》<sup>[13]</sup>、CNAS-CL01-G003: 2019《测量不确定度的要求》<sup>[14]</sup>要求,按照食品安全国家标准 GB 5009.211—2014《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》<sup>[15]</sup>规定的方法对婴儿配方食品中叶酸含量进行测定,依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示技术规范》<sup>[16]</sup>和 GB/Z 22553—2010《利用重复性、再现性和正确度的估计值评估测量不确定度的指南》<sup>[17]</sup>对测定过程中影响检验结果的各个分量进行分析、评估,合成不确定度,计算扩展不确定度,用来表征乳粉中叶酸含量真值所处范围,以便使用者正确的利用测量结果,为微生物法测定维生素的不确定度评估提供重要的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试样:叶酸定值样品:婴儿配方乳粉(QC-IP-705,中国检科院测试评价中心)。

菌种:鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus Casei* spp. *rhamnosus*) (美国典型菌种保藏中心 ATCC 7469)。

标准品:叶酸(标准品,纯度 99.5%,批号:1-F-30C,美国卡托研究所)。

培养基及试剂:乳酸杆菌琼脂培养基(批号:190712)、乳酸杆菌肉汤培养基(批号:200323)、叶酸测定用培养基(批号:200326)(北京陆桥生物技术有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

高压蒸汽灭菌锅(HVA-85)(日本 HIRAYAMA 公司);恒温培养箱(INE500)(德国 MEMMERT 公司);电子分析天平(BP221S,精度 0.0001 mg)(北京赛多利斯科学仪器有限公司);电子天平(PL601-L,精度 0.01 mg)(瑞士 MettlerTodedo 公司);紫外可见分光光度计(Cary60)(美国安捷伦公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 标准溶液的制备

按 GB 5009.211—2014 标准第 3.5 节要求操作。

#### 1.3.2 测试用接种液的制备

取 1 管鼠李糖乳杆菌(ATCC 7469)活化。取 2 mL 叶酸标准工作液(0.200 ng/mL)与 4 mL 叶酸测定用培养液混匀,分装至 2 支无菌试管中,具塞。121 °C 高压灭菌 15 min 后即成为种子培养液。冷却后用接种环将活化的菌株转种至 2 支种子培养液中,37 °C 培养 24 h。取出后混匀取 0.5 mL 转种于另 2 支叶酸测定用培养液中,37 °C 培养 6 h,混匀即为接种液。

### 1.4 试样处理与测定

#### 1.4.1 试样处理

称取一定量的试样,转入 100 mL 锥形瓶中,加入 80 mL 氢氧化钠乙醇溶液(0.01 mol/L),具塞,超声 4 h,用水定容至刻度。稀释,使其叶酸浓度为 0.36 ng/mL。

#### 1.4.2 试样测定

按照 GB 5009.211—2014 6.4~6.7 节要求,制备标准系列管、试样系列管、灭菌、接种、培养和测定。

### 1.5 绘制标准曲线

以标准系列管叶酸含量(ng)为横坐标(0.00、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80、1.00 ng),每个标准点 OD 550 nm 吸光度均值为纵坐标,绘制标准曲线。

### 1.6 试样稀释液中叶酸浓度计算

从标准曲线查得试样管中叶酸的相应含量( $C_X$ ),试样稀释液叶酸浓度计算见式(1)。

$$c = \frac{C_X}{V_X} \quad (1)$$

式中: $c$ :试样稀释液中叶酸浓度,ng/mL; $C_X$ :从标准曲线上查得试样系列管中叶酸含量,ng; $V_X$ :制备试样系列管时吸取的试样稀释液体积,mL。

### 1.7 试样中叶酸含量计算

试样中叶酸的含量按 GB 5009.211—2014 标准中 6.8.2 节计算,见公式(2)。

$$X = \frac{\bar{c} \times V \times f}{m} \times \frac{100}{1000} \quad (2)$$

式中: $X$ :试样中叶酸含量, $\mu\text{g}/100\text{g}$ ; $\bar{c}$ :试样稀释液叶酸浓度平均值,ng/mL; $V$ :试样提取液定容体积,mL; $f$ :试样

提取液稀释倍数;  $m$  试样的质量, g;  $\frac{100}{1000}$ : 由 ng/g 换算为  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  的系数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不确定度来源分析

根据 CNAS-CL01-G003:2019 要求, 依据 RB/T 151—2016 《食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南》<sup>[18]</sup>、JJF 1059.1—2012 分析, 微生物法测定叶酸含量, 在测定过程影响检验结果的因素主要包括测量重复性、试样前处理(称量、稀释)、标准物质(叶酸标准品, 纯度 99.5%)、标准溶液配制(称量、稀释)、实验温度、拟合标准曲线、仪器(紫外分光光度计)。因此, 不确定度应从以上来源因素评估<sup>[19-22]</sup>。

### 2.2 测量不确定度评估

#### 2.2.1 测量重复性引入的不确定度

重复测量产生的不确定度属于 A 类不确定度<sup>[23]</sup>。按照 GB 5009.211—2014 对定值样品的叶酸含量进行 10 次平行测定, 结果见表 1。

采用贝塞尔公式法, 计算出实验标准差, 见式(3)。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (x_i - 80.89)^2}{10-1}} = 0.9054。 \quad (3)$$

按 GB 5009.211—2014, 检测结果取 2 个平行结果平均值, 重复 2 次测试引入的不确定度计算见式(4)。

$$u(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.9054}{\sqrt{2}} = 0.6403。 \quad (4)$$

相对标准不确定度, 见式(5)。

$$u_{\text{rel}}(\bar{x}) = \frac{u(\bar{x})}{\bar{x}} = \frac{0.6403}{80.89} = 7.92 \times 10^{-3}。 \quad (5)$$

#### 2.2.2 试样前处理引入的不确定度

##### (1) 试样称量引入的不确定度

试样称量引入的不确定度按 B 类不确定度评定标准不确定度。用电子天平(精度为 0.0001 mg)准确称取样品

0.5009 g, 即 500.9 mg, 根据天平检定证书, 最大重复性误差  $a_1=0.0002\text{ mg}$ , 当  $0 \leq m \leq 100\text{ g}$  时, 示值误差  $a_2=0.0007\text{ mg}$ 。采用矩阵分布, 包含因子  $k$  为  $\sqrt{3}$ , 见式(6)。

$$u_1 = \frac{a_1}{k} = \frac{0.0002}{\sqrt{3}} = 1.15 \times 10^{-4}\text{ mg};$$

$$u_2 = \frac{a_2}{k} = \frac{0.0007}{\sqrt{3}} = 4.04 \times 10^{-4}\text{ mg}。 \quad (6)$$

合成标准不确定度, 见式(7)。

$$u(m_1) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{(1.15 \times 10^{-4})^2 + (4.04 \times 10^{-4})^2} = 4.2 \times 10^{-4}。 \quad (7)$$

试样称量时的相对标准不确定度, 见式(8)。

$$u_{\text{rel}}(m_1) = \frac{u(m_1)}{m_1} = \frac{4.2 \times 10^{-4}}{500.9} = 8.38 \times 10^{-7}。 \quad (8)$$

##### (2) 试样稀释引入的不确定度

试样前处理和稀释过程中分别用到了 10 mL 移液器和 100 mL 容量瓶, 根据 JJG 646—2006 《移液器检定规程》<sup>[24]</sup>、JJG 196—2006 《常用玻璃量具检定规程》<sup>[25]</sup>、GB/T 12806—2011 《实验室玻璃仪器 单标线容量瓶》<sup>[26]</sup> 可知移液器和容量瓶的最大允差, 按矩形分布处理, 包含因子  $k$  为  $\sqrt{3}$ , 计算不确定度分量见式(9)。相对标准不确定度见式(10)。样品前处理过程中移液器和玻璃器皿引入的不确定度见表 2。

$$u(v_{\text{ai}}) = \frac{\text{最大允许误差}}{\sqrt{3}} \quad (9)$$

$$u_{\text{rel}}(v_{\text{ai}}) = \frac{u(v_{\text{ai}})}{v_{\text{ai}}} \quad (10)$$

在样品稀释过程中, 使用 100 mL 容量瓶 1 次, 10 mL 移液器移取 10 mL 2 次, 综上所述, 计算样品前处理过程中引入的相对标准不确定度见式(11)。

$$u_{\text{rel}}(v_{\text{a}}) = \sqrt{(u_{v100})^2 + 2(u_{v10})^2} = 8.24 \times 10^{-4}。 \quad (11)$$

##### (3) 样品前处理引入的不确定度

样品前处理引入的不确定度的合成见式(12)。

表 1 定值样品维生素 B<sub>12</sub> 平行测试结果

Table 1 Parallel test results of vitamin B<sub>12</sub> in constant value samples

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值
结果/( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	80.11	79.32	81.59	81.38	79.56	82.11	81.37	81.15	80.95	81.39	80.89

表 2 样品前处理过程中移液器和玻璃器皿引入的不确定度

Table 2 Uncertainty introduced by pipette and glassware during sample pretreatment

玻璃器皿与移液器	最大允许误差	定容或移取体积 $v_{\text{ai}}$	不确定度 $u(v_{\text{ai}})$	相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(v_{\text{ai}})$
100 mL 单标线容量瓶 A 级	$\pm 0.02\text{ mL}$	100 mL	0.01155	$u_{v250} = 1.15 \times 10^{-4}$
10 mL 移液器 10 mL 检定点	$\pm 1.0\%$	10 mL	0.00577	$u_{v10} = 5.77 \times 10^{-4}$

$$u_{rel}(S_1) = \sqrt{u_{rel}(m_1)^2 + u_{rel}(v_a)^2} = \sqrt{(8.38 \times 10^{-7})^2 + (8.24 \times 10^{-4})^2} = 8.24 \times 10^{-4} \quad (12)$$

2.2.3 标准物质引入的不确定度

根据叶酸标准品说明书, 其纯度  $p=(99 \pm 0.1)\%$ , 按 B 类不确定度评定, 区间的半宽度为 0.001, 按均匀分布, 包含因子为  $\sqrt{3}$ , 则标准品引入的不确定度见式(13)。

$$u_{rel}(p) = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-4} \quad (13)$$

2.2.4 标准溶液配制引入的不确定度

(1)标准品称量引入的不确定度

标准品称量引入的不确定度按 B 类不确定度评定, 用电子天平(精度为 0.001 mg)准确称取叶酸标准品  $m_2=20.005$  mg, 根据天平检定证书, 当  $0.001 \leq m \leq 10$  g 时, 示值误差  $a_1=0.001$  mg, 最大重复性误差  $a_2=0.003$  mg。采用矩阵分布, 包含因子为  $\sqrt{3}$ , 标准不确定度见式(14)、(15)。

$$u_1 = \frac{a_1}{k} = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-4} \quad (14)$$

$$u_2 = \frac{a_2}{k} = \frac{0.003}{\sqrt{3}} = 1.73 \times 10^{-3} \quad (15)$$

合成标准不确定度见式(16)。

$$u(m_2) = \sqrt{(1.73 \times 10^{-3})^2 + (5.77 \times 10^{-4})^2} = 1.82 \times 10^{-3} \quad (16)$$

标准品称量时的相对标准不确定度见式(17)。

$$u_{rel}(m_2) = \frac{u(m_2)}{m_2} = \frac{1.82 \times 10^{-3}}{20.005} = 9.10 \times 10^{-6} \quad (17)$$

(2)标准溶液配制过程中稀释引入的不确定度

标准溶液配制过程中分别用到了 1 mL 移液器和 1000、100、5 mL 容量瓶。根据 JJG 646—2006《移液器检定规程》、

JJG 196—2006《常用玻璃量具检定规程》、GB/T 12806—2011《实验室玻璃仪器单标线容量瓶》可知移液器和容量瓶的最大允差, 取矩形分布, 标准溶液稀释过程中玻璃器皿和移液器引入的不确定度见表 3。

在标准溶液稀释过程中, 使用 1000 mL 容量瓶 2 次, 使用 100 mL 容量瓶 1 次, 使用 5 mL 容量瓶 1 次, 1 mL 移液器移取 1 mL 3 次, 综上所述, 计算标准溶液配制过程中引入的相对标准不确定度见式(18)。

$$u_{rel}(v_{cal}) = \sqrt{2(u_{v1000})^2 + (u_{v100})^2 + (u_{v5})^2 + 3(u_{v1})^2} = 2.52 \times 10^{-3} \quad (18)$$

(3)标准溶液配制引入的不确定度的合成

$$u_{rel}(S_2) = \sqrt{u_{rel}(m_2)^2 + u_{rel}(v_{cal})^2} = \sqrt{(9.10 \times 10^{-6})^2 + (2.52 \times 10^{-3})^2} = 2.52 \times 10^{-3} \quad (19)$$

2.2.5 实验过程中温度引入的不确定度

实验室温度变化介于  $(20 \pm 5)$  °C, 玻璃量器与移液器的检定在 20 °C 条件下进行, 液体的膨胀系数远大于玻璃的, 因此玻璃的膨胀系数忽略不计, 只计算由温度波动引起的不确定度。样品稀释和标准工作液的配制均使用纯水, 水在 20 °C 时的膨胀系数为  $1.80 \times 10^{-3}$  mL/°C, 假设温度变化为矩形分布, 为  $\sqrt{3}$ , 温度产生的标准不确定度见式(20)。

$$u_{rel}(T) = \frac{1.8 \times 10^{-3}}{\sqrt{3} \times 20} = 5.2 \times 10^{-5} \quad (20)$$

2.2.6 拟合标准曲线引入的不确定度

按照按 GB 5009.211—2014 中 6.4.2 节, 标准系列管取 8 个叶酸含量点, 每个含量点做 3 个平行, 实验数据见表 4。

表 3 标准溶液配置过程中移液器和玻璃器皿引入的不确定度

Table 3 Uncertainty introduced by pipette and glassware during standard solution preparation

玻璃器皿与移液器	最大允许误差	定容或移取体积	不确定度	相对标准不确定度
1000 mL 单标线容量瓶 A 级	$\pm 0.02$ mL	1000 mL	0.01155	$u_{v1000} = 1.16 \times 10^{-5}$
100 mL 单标线容量瓶 A 级	$\pm 0.02$ mL	100 mL	0.01155	$u_{v100} = 1.16 \times 10^{-4}$
5 mL 单标线容量瓶 A 级	$\pm 0.02$ mL	5 mL	0.01155	$u_{v5} = 2.31 \times 10^{-3}$
1 mL 移液器 1 mL 检定点	$\pm 0.1\%$	1 mL	0.000577	$u_{v1} = 5.77 \times 10^{-4}$

表 4 标准曲线数据

Table 4 Data for drawing standard curves

标曲管	叶酸含量/ng	吸光度(A)				相对标准偏差
		平均值	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
S1	0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
S2	0.05	0.1416	0.1417	0.1415	0.1416	0.0007
S3	0.10	0.2752	0.2627	0.2897	0.2733	0.0494

表4(续)

标尿管	叶酸含量/ng	吸光度(A)				相对标准偏差
		平均值	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
S4	0.20	0.4434	0.4599	0.4269	0.4356	0.0388
S5	0.30	0.5962	0.5888	0.6068	0.593	0.0158
S6	0.40	0.7217	0.7199	0.7249	0.7204	0.0038
S7	0.50	0.8506	0.8766	0.8238	0.8513	0.0310
S8	0.60	0.9428	0.9436	0.9422	0.9427	0.0008
S9	0.80	1.2220	1.2089	1.2354	1.2217	0.0108
S10	1.00	1.3222	1.2814	1.3607	1.3245	0.0300

以叶酸标准品的含量为横坐标,吸光度值为纵坐标拟合标准曲线。得到线性回归方程为  $Y=1.3181X+0.1309$  ( $a=0.1309, b=1.3181$ ), 标准溶液总测定次数  $m=3 \times 8=24$ , 则标准系列管吸光值残差的标准差见式(21)。

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)]^2}{m-1}} = 4.81 \times 10^{-2}. \quad (21)$$

式中:  $y_i - (a + bx_i)$  叶酸含量为  $x_i$  时, 仪器测得的吸光值与按标准曲线计算的理论吸光值差值。

各标准溶液浓度的离均差平方和见式(22)。  $C_i$  表示各标准溶液叶酸含量, ng;  $\bar{C}$  表示各标准溶液叶酸含量平均值 0.395 ng。

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 = 0.981. \quad (22)$$

使用该曲线进行测量时, 按照 GB 5009.211—2014 中 6.4 节, 试样系列测试管中加入的试样稀释液量取 4 个点, 每个点做 3 个平行, 即被测样品测定 12 次 ( $p=12$ ), 测得各管吸光值, 依据标准曲线查得的各试样测试管中叶酸含量见表 5。

最终叶酸的标准工作曲线拟合所引入的标准不确定度见式(23)。

$$u_{\text{std}} = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{m} + \frac{(\bar{C}_x - \bar{C})^2}{S_{xx}}} = 1.45 \times 10^{-2}. \quad (23)$$

则叶酸的标准曲线拟合的相对标准不确定度见式(24)。

$$u_{\text{rel}}(C) = \frac{u_{\text{std}}}{C_x} = \frac{1.45 \times 10^{-2}}{0.5738} = 2.53 \times 10^{-2}. \quad (24)$$

### 2.2.7 紫外可见分光光度计分析引入的不确定度

依据紫外可见分光光度计检定证书(宁波中检公司出具), 仪器的扩展不确定度为 0.4%,  $k=2$ , 则由仪器分析引入的相对标准不确定度见式(25)。

$$u_{\text{rel}}(E) = \frac{0.004}{2} = 2.0 \times 10^{-3}. \quad (25)$$

## 2.3 不确定度的合成、扩展和表示

### 2.3.1 合成不确定度的计算

综上, 实验过程中, 影响检验结果的各个因素及其引入的相对标准不确定度分量见表 6。

综合各不确定度分量, 合成标准不确定度, 合成乳粉中叶酸含量测定的相对标准不确定度见式(26)。

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{\frac{u_{\text{rel}}(\bar{x})^2 + u_{\text{rel}}(S_1)^2 + u_{\text{rel}}(p)^2}{+u_{\text{rel}}(S_2)^2 + u_{\text{rel}}(T)^2}} = 0.0267. \quad (26)$$

试样测定平均值  $C_0=80.2 \mu\text{g}/100 \text{g}$ , 则叶酸定值样品乳粉测定的不确定度见式(27)。

$$uc(X) = C_0 \times u_{\text{rel}}(X) = 80.2 \times 0.0267 = 2.14 \mu\text{g}/100 \text{g}. \quad (27)$$

表5 试样测试管中叶酸测定数据

Table 5 Determination data of folic acid in sample test tube

试样稀释液/mL	吸光度值 A <sub>1</sub>	叶酸含量/ng	吸光度值 A <sub>2</sub>	叶酸含量/ng	吸光度值 A <sub>3</sub>	叶酸含量/ng	叶酸含量总平均值 $\bar{C}_x$ /ng
0.5	0.5822	0.3424	0.5811	0.3416	0.5820	0.3422	
1.0	0.9166	0.5961	0.8734	0.5633	0.8304	0.5307	0.5738
2.0	1.1968	0.8087	1.2292	0.8332	1.1944	0.8068	

线性回归方程为  $Y=1.3181X+0.1309(r^2=0.9701)$

表6 相对标准不确定度分量  
Table 6 Relative standard uncertainty component

影响因素	相对标准不确定度
测量重复性	$u_{\text{rel}}(\bar{x}) = 7.92 \times 10^{-3}$
试样前处理(称量、稀释)	$u_{\text{rel}}(S_1) = 8.24 \times 10^{-4}$
标准物质	$u_{\text{rel}}(p) = 5.77 \times 10^{-4}$
及标准溶液配制(称量、稀释)	$u_{\text{rel}}(S_2) = 2.52 \times 10^{-3}$
实验温度	$u_{\text{rel}}(T) = 5.2 \times 10^{-5}$
拟合标准曲线	$u_{\text{rel}}(C) = 2.53 \times 10^{-2}$
紫外可见分光光度计分析	$u_{\text{rel}}(E) = 2.0 \times 10^{-3}$

### 2.3.2 扩展不确定度

假设测定结果按正态分布,置信水平为95%时,包含因子 $k=2$ ,则扩展不确定度 $U=uc(X) \times k=2.14 \mu\text{g}/100 \text{g} \times 2=4.28 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 。

### 2.3.3 不确定度的表示

定值样品乳粉的叶酸含量(C)可表示为 $(80.2 \pm 4.28) \mu\text{g}/100 \text{g}$  ( $k=2$ ),置信水平为95%。即定值样品乳粉试样中叶酸含量真值在95%的概率下不大于 $(80.2+4.28) \mu\text{g}/100 \text{g}$ ,不小于 $(80.2-4.28) \mu\text{g}/100 \text{g}$ 。

## 3 结论

GB 5009.211—2014《食品中叶酸的测定》的原理为叶酸是鼠李糖乳杆菌生长所必需营养素,利用鼠李糖乳杆菌对叶酸的特异性和灵敏性,在测定培养基中供给除叶酸以外的所有营养成分,这样微生物生长产生的透光率就会同标准曲线工作液及未知待测溶液中叶酸的含量相对应。以不同浓度标准溶液的透光率相对于各浓度水平标准物质的浓度绘制标准曲线,根据标准曲线即可计算出试样中叶酸的含量。本研究按照标准GB 5009.211—2014,测定叶酸定值样品乳粉中叶酸含量,分析测定过程关键技术并进行不确定度评估。结果显示,测量不确定度主要来源于标准曲线拟合,其次是测量重复性,而这2个过程均和微生物因素密切相关,分析认为微生物法测量影响因素的离散性较大,建议实验过程中必须严格控制实验条件,严格规范操作,从而获得重复性好的理想结果,减小测量结果的不确定度,保证检测结果的质量。本研究由玻璃仪器、移液器、温度、仪器分析引入的不确定度相对较小,在日常实验中应购买正规厂家玻璃仪器,注意玻璃仪器、移液器、温度计、分析仪器的计量和维护,尽量保持仪器较高的灵敏度,并定期对所涉仪器进行检定。

本次实验称量引入的不确定度几乎可以忽略不计,分析认为本次实验使用了比标准要求精度更高的天平。该方法是通过微生物生长消耗叶酸从而间接测量试样中叶酸含量,因此在评估不确定度时,还应该考虑微生物接种量、

微生物活性、培养温度、培养时间等引起的不确定度,不过实际实验过程中微生物接种量(20  $\mu\text{L}$ )固定,培养温度(37 $\pm$ 1  $^{\circ}\text{C}$ )一定,培养时间(20~40 h)范围宽泛,最终培养直至获得最大浊度(即再培养2 h,吸光度值无明显变化),考虑到这些条件变异不能直接反映到检测结果中,因此实验过程严格按标准操作,这些因素可以忽略不计。

本研究通过对乳粉中叶酸的不确定度进行评估,明确了测定过程中不确定度的主要来源,为实验室针对性质量管理提供了技术支撑,此不确定度的评估具有一定的广泛性,适用于同类实验的每一次检测。

## 参考文献

- [1] MARTA CK, ELŻBIETA G, JOANNA M. Testing of different extraction procedures for folate HPLC determination in fresh fruits and vegetables [J]. *J Food Compos Anal*, 2016, 57(4): 64–72.
- [2] AMIRAH MG, MATHILDE L, LUDOVIC C, *et al.* Stability of folic acid under several parameters [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 93(10): 419–430.
- [3] TYAGI K, UPADHYAYA P, SARMA S, *et al.* High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for profiling and quantitative analysis of foiate monoglutamates in tomato [J]. *Food Chem*, 2015, 179(7): 76–84.
- [4] SAINI RK, NILE SH, KEUM YS. Folate: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability [J]. *Food Res Int*, 2016, 89(11): 1–13.
- [5] 康文怀, 叶晓利, 李慧, 等. 食品中叶酸分析方法及稳定性研究进展[J]. *河北科技大学学报*, 2019, 40(5): 446–453.  
KANG WH, YE XL, LI H, *et al.* Research progress on analytical methods and stability of folic acid in food [J]. *J Hebei Univ Sci Technol*, 2019, 40(5): 446–453.
- [6] 王翔朴, 王营通, 李珏声. 卫生学大辞典[M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.  
WANG XP, WANG YT, LI JS. A dictionary of hygiene [M]. Qingdao: Qingdao Press, 2000.
- [7] ADOLPHSON SJ, DUNN ML, NIEISEN-BARROWS S, *et al.* Evaluation of bacterial effects on folic acid loss in fortified, nixtamalized corn masa flour [J]. *Cereal Chem*, 2016, 93(5): 508–512.
- [8] FAJARDO V, ALONSO-PERTE E, VARELA-MOREIRAS G. Total folate content in ready-to-eat vegetable meals from the Spanish market [J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 64(10): 223–231.
- [9] 徐硕, 金鹏飞, 邝咏梅, 等. HPLC法测定复合维生素B片中的微量叶酸、维生素B<sub>12</sub>和生物素[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(6): 1091–1097.  
XU S, JIN PF, KUANG YM, *et al.* Determination of folic acid, vitamin B<sub>12</sub> and biotin in compound vitamin B tablets by HPLC [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 38(6): 1091–1097.
- [10] GORELOVA V, AMBACH L, RÉBEILLÉ F, *et al.* Folate in plants: Research advances and progress in crop biofortification [J]. *Front Chem*, 2017, 5(3): 1–20.
- [11] ANASTASIYA S, NOVIKOVA, TATIANA S, *et al.* Fluorescent AgInS/ZnS quantum dots microplate and lateral flow immunoassays for folic acid determination in juice samples [J]. *Microchim Acta*, 2020, 187(8): 1–9.
- [12] 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<sub>12</sub>接种液制备方法的优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(1):

- 100–104.  
HUANG JL, YANG ZW, CHEN YL, *et al.* Optimization of preparation method for microbial detection of folic acid, biotin and vitamin B<sub>12</sub> [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(1): 100–104.
- [13] CANS-GL05: 2011 测量不确定度要求的实施指南[S].  
CANS-GL05: 2011 Guidance on the application of the requirements for measurement uncertainty [S].
- [14] CNAS-CL01-G003: 2019 测量不确定度的要求[S].  
CNAS-CL01-G003: 2019 Requirements for measurement uncertainty [S].
- [15] 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 food [S].
- [16] JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示技术规范[S].  
JJF 1059.1—2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [17] GB/Z 22553—2010 利用重复性、再现性和正确度的估计值评估测量不确定度的指南[S].  
GB/Z 22553—2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation [S].
- [18] RB/T 151—2016 食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南[S].  
RB/T 151—2016 Guidelines for the estimation of measurement uncertainty of food microbiological quantitative detection [S].
- [19] 雷质文. 食品微生物实验室质量管理手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.  
LEI ZW. Quality management manual for food microbiology laboratory [M]. Beijing: China Standard Press, 2006.
- [20] 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, 12(42): 37–40.  
ZHANG SJ, LI J, LIN YW, *et al.* Evaluation of uncertainty in determination of pantothenic acid in infant milk powder by microbiological method [J]. *China Dairy Ind*, 2014, 12(42): 37–40.
- [21] 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.* Evaluation of uncertainty in microbiological determination of biotin in infant formula food [J]. *J Chin I Food Sci Technol*, 2019, 19(10): 221–226.
- [22] 李莹婷. 荧光分光光度法测定食品中抗坏血酸的不确定度评估[J]. *现代食品*, 2017, 2(3): 120–122.  
LI YT. Evaluation of uncertainty in the determination of ascorbic acid in food by fluorescence spectrophotometry [J]. *Mod Food*, 2017, 2(3): 120–122.
- [23] JJF 1135—2005 化学分析测量不确定度测定[S].  
JJF 1135—2005 Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement [S].
- [24] JJG 646—2006 移液器检定规程[S].  
JJG 646—2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].
- [25] JJG 196—2006 常用玻璃量具检定规程[S].  
JJG 196—2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [26] GB/T 12806—2011 实验室玻璃仪器 单标线容量瓶[S].  
GB/T 12806—2011 Laboratory glassware-One-mark volumetric flasks [S].

(责任编辑: 张晓寒)

## 作者简介



史方, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 729521505@qq.com



李轲, 高级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: like77312@163.com