

微孔板法测定乳粉中叶酸含量的不确定度分析

Analysis of uncertainty in determination of folic acid in milk powder by microplate method

刘子音 卓一鸣 刘腊兰 彭 纳 吴后吕

LIU Ziyin ZHUO Yiming LIU Lalan PENG Na WU Houlu

(长沙市食品药品检验所, 湖南 长沙 410016)

(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha, Hunan 410016, China)

摘要:目的:对微孔板法测定乳粉中叶酸含量的不确定度进行分析评估。方法:按 GB 5009.211—2022 中微孔板法测定婴儿配方乳粉中叶酸含量,依据 JJF 1059.1—2012、CNAS-CL01-G003:2021 和 CNAS-GL05:2011 等不确定度评定方法和指南对影响检测结果的各种试验因素进行分析、计算,得到合成标准不确定度及扩展不确定度。结果:扩展不确定度 $U_{95}=22.08 \mu\text{g}/100 \text{ g}(k=2)$,样品中叶酸含量为 $(282.33 \pm 22.08) \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。不确定度主要来源于接种微孔板过程、标准曲线拟合和测量重复性。结论:移液器的准确度和微生物因素对试验结果影响较大,需保证仪器质量并严格按照标准化流程操作以降低不确定度。

关键词:叶酸;乳粉;微孔板法;不确定度

Abstract: **Objective:** To analyze and evaluate the uncertainty of the determination of folic acid content in milk powder by microplate method. **Methods:** The content of folic acid in infant formula milk powder was determined by microplate method according to GB 5009.211—2022 "National Standard for Food Safety-Determination of Folic Acid in Foods". Various experimental factors affecting the test results were analyzed and calculated according to the uncertainty evaluation methods and guidelines such as JJF 1059.1—2012, CNAS-CL01-G003:2021 and CNAS-GL05:2011, and the synthetic standard uncertainty and expanded uncertainty were obtained. **Results:** The expanded uncertainty $U_{95}=22.08 \mu\text{g}/100 \text{ g}(k=2)$, and the folate content of the sample was $(282.33 \pm 22.08) \mu\text{g}/100 \text{ g}$. The uncertainty mainly comes from the process of microplate inoculation, the fitting of standard curve and the repeatability of measurement.

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:2021JJ80077)

作者简介:刘子音,女,长沙市食品药品检验所助理研究员,硕士。

通信作者:卓一鸣(1987—),男,长沙市食品药品检验所高级工程师,硕士。E-mail:715467375@qq.com

收稿日期:2023-07-16 **改回日期:**2023-11-25

Conclusion: The accuracy of pipettes and microbial factors have a great impact on the experimental results, so it is necessary to ensure the quality of the instrument and strictly follow the standardized procedures to minimize the uncertainty.

Keywords: folic acid; milk powder; microporous plate method; uncertainty

叶酸,或称维生素 B₉、维生素 M,广泛参与人体内蛋白质、核酸的代谢和细胞增殖,并且是血红蛋白的组分之一,对人体尤其是孕妇和婴幼儿的健康至关重要^[1]。孕妇缺乏叶酸可致胎儿畸形,婴幼儿缺乏叶酸会阻碍神经系统发育及引发巨幼细胞性贫血^[2-4]。中国食品安全标准对婴、幼儿配方食品中叶酸含量都有强制性要求^[5]。叶酸含量的检测方法主要有液相色谱法^[6-9]、分光光度法^[8-9]、酶联免疫法^[10-11]、微生物法^[12-13]等。由于叶酸不稳定,见光、受热易分解^[14],因此不适于采用理化方法检测。目前,微生物法是 GB 5009.211—2022 指定的仲裁方法,并在 2014 版的试管法基础上增添了新的微孔板法。微孔板法相较于试管法所耗试剂更少,测定更加快捷,但因培养体积变小,试验的不确定性发生变化。研究拟按 GB 5009.211—2022 中微孔板法对婴儿配方乳粉中的叶酸含量进行同条件下的 10 次平行测定,依据 CNAS-CL01-G003:2021、CNAS-GL05:2011、JJF 1059.1—2012 等标准对影响检测结果的各种因素进行分析和评估,计算各分量的不确定度,综合处理后得到合成标准不确定度及扩展不确定度^[15],以为实验室质量控制和试验流程优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 耗材试剂

婴儿配方乳粉:长沙市食品药品检验所抽检样;

叶酸标准品:纯度 $\geq 99.0\%$,国家标准物质中心;

鼠李糖乳杆菌: ATCC7479, 美国模式培养物保藏中心;

菌种储备用琼脂培养基、叶酸测定用培养基: 北京路桥技术股份有限公司;

微孔板(96 孔)、滤膜(0.22 μm): 美国康宁公司。

1.1.2 仪器与设备

电子天平: BSA224S 型, 北京赛多利斯科学仪器有限公司;

高压灭菌器: SM830 型, 重庆雅马拓科技有限公司;

生化培养箱: LRH-250F 型, 上海一恒科技有限公司;

移液器: 1 mL、200 μL 量程, 美国 Eppendorf 公司;

容量瓶: 100, 1 000 mL 容积, 湖南湘玻科学仪器有限公司;

多功能酶标仪: Ensight 型, 新加坡 PerkinElmer 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制 参照 GB 5009.211—2022。

1.2.2 接种液的制备 按 GB 5009.211—2022 要求操作, 将鼠李糖乳杆菌菌种转接至菌种储备用琼脂培养基中, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养 20~24 h, 连续传种 2~3 代, 挑取单菌落接种至含有叶酸的叶酸测定用培养液中, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养 20~24 h, 转接至不含叶酸的叶酸测定用培养液中饥饿培养 6 h, 得到接种液。

1.2.3 样液制备 称取约 0.1 g 样品于锥形瓶中, 加入 80 mL 氢氧化钠乙醇溶液, 具塞, 超声振荡 2 h, 转入 100 mL 容量瓶中, 用无菌水定容。取 1 mL 无菌水稀释 10 倍, 过滤除菌, 得到样品待测液。

1.2.4 样品测定 按 GB 5009.211—2022 中微孔板法制备试样系列管和标准系列管(均过滤除菌), 与含有接种液的测定用培养基(40 μL 接种液/10 mL 培养基)各 150 μL 一起转接至微孔板, 覆膜, 混匀, 于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养 32~40 h, 用酶标仪快速测定 540 nm 处吸光值(若 0 对照孔出现浑浊, 说明可能有杂菌污染, 需重做)。

1.2.5 数学模型的建立 按式(1)计算样品中叶酸含量。

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \times \frac{100}{1\,000}, \quad (1)$$

式中:

X ——样品中叶酸含量, $\mu\text{g}/100\text{ g}$;

c ——样品待测液叶酸浓度的平均值, ng/mL ;

V ——样品溶液定容体积, mL ;

f ——样品溶液稀释倍数;

m ——样品称取量, g 。

1.2.6 数据处理 对各分布类型数据的处理方法及运用到的计算公式参考 JJF 1059.1—2012; 标准曲线的二项式回归方程由 Excel 程序生成; 二项式方程转换为直线方程的处理方法参考相关文献。

2 结果与分析

2.1 不确定度来源

微孔板法测定叶酸含量过程中的不确定度来源主要有: ① 标准溶液制备引入的不确定度, 包括标准品的纯度、标准物质的称量、稀释, 标准系列管的配制; ② 样液制备引入的不确定度, 包括样品的称量和稀释, 试样系列管的配制; ③ 接种微孔板过程引入的不确定度; ④ 拟合标准曲线引入的不确定度; ⑤ 酶标仪仪器误差产生的不确定度; ⑥ 测量重复性引入的不确定度。

2.2 各不确定度分量评定

2.2.1 标准溶液制备引入的不确定度

(1) 标准品纯度引入的不确定度: 说明书显示其纯度 $p \geq 99.0\%$, 考虑其在 $99.0\% \sim 100.0\%$ 区间按均匀分布, 则区间半宽度为 0.005, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 其标准不确定度 $u(P) = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 0.002\,9$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P) = \frac{u(P)}{P} = \frac{0.002\,9}{0.99} = 0.002\,9$ 。

(2) 标准品称量引入的不确定度: 用万分之一天平准确称取 20.2 mg 叶酸标准品, 天平引入的不确定度主要来源于示值校准、分辨率和重复性。电子天平校准证书显示, 其在 $0 \sim 1\text{ g}$ 范围内示值的扩展不确定度为 0.3 mg ($k = 2$), 则标准不确定度 $u(m_{\text{标}}) = \frac{U}{k} = \frac{0.3\text{ mg}}{2} =$

0.15 mg; 电子天平分辨率为 0.1 mg, 半区间取 0.05 mg, 按均匀分布处理, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则标准不确定度 $u(m_{\text{辨}}) = \frac{0.05\text{ mg}}{\sqrt{3}} = 0.029\text{ mg}$ 。合成二者的标准不确定度

$u(m_{\text{s1}}) = \sqrt{u(m_{\text{标}})^2 + u(m_{\text{辨}})^2} = \sqrt{0.15^2 + 0.029^2} = 0.153\text{ mg}$, 去皮和称样共用了两次天平, 合成两次的不确定度

$u(m_{\text{s2}}) = \sqrt{2 \times u(m_{\text{s1}})^2} = 0.216\text{ mg}$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_{\text{s}}) = \frac{u(m_{\text{s2}})}{m} = \frac{0.216\text{ mg}}{20.2\text{ mg}} = 0.010\,7$ 。

(3) 配制标准工作液引入的不确定度: 将称取的标准品溶解定容至 1 000 mL 容量瓶中, 制成叶酸标准储备液, 并吸取 1.0 mL 定容至 100 mL 容量瓶制成叶酸标准中间液, 从中间液中吸取 1.0 mL 定容至 1 000 mL 容量瓶中得到叶酸标准工作液。配制过程使用到 1 000 mL 容量瓶 2 次, 100 mL 容量瓶 1 次, 1 mL 移液器 2 次。容量瓶和移液器的校准、测量重复性、温度波动引起的液体体积变化是溶液配制过程不确定度的主要来源, 由各量具校准证书查得其在检定温度 20°C 时容量校准的扩展或相对扩展不确定度, 则相应的标准或相对标准不确定度 = $\frac{\text{扩展/相对扩展不确定度}}{\text{包含因子 } k}$, 具体结果见表 1。

表1 标准工作液配制过程量具校准引入的不确定度

Table 1 Calibration uncertainty of gauges in preparation of standard working solution

量具	使用次数	扩展/相对扩展 不确定度($k=2$)	标准不确定度/mL	相对标准 不确定度
1 000 mL 单标容量瓶	2	0.20 mL	0.1	1.0×10^{-4}
100 mL 单标容量瓶	1	0.03 mL	0.015	1.5×10^{-4}
1 mL 量程移液器	2	0.3%	0.001 5	1.5×10^{-3}

水在 20 °C 时膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 设室温波动为 $\pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$, 按均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$, 则温度引起的不确定度 $u(t) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \times 5 \text{ } ^\circ\text{C} \times V_{\text{取液量}}}{\sqrt{3}}$, 每使用一次容量瓶或移液器都会引入该不确定度。试验环境不变时, 其相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(t) = \frac{u(t)}{V_{\text{取液量}}} = 6.0 \times 10^{-4}$, 为固定值。

合成标准工作液配制过程引入的相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{sl}}) = [2 \times (1.0 \times 10^{-4})^2 + (1.5 \times 10^{-4})^2 + 2 \times (1.5 \times 10^{-3})^2 + 5 \times (6.0 \times 10^{-4})^2]^{\frac{1}{2}} = 0.002 \text{ 5}。$$

(4) 配制标准系列管引入的不确定度: 使用 200 μL 和 1 mL 量程移液器吸取 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80, 1.00 mL 叶酸标准工作液至离心管, 补水至 1.0 mL, 共 10 个梯度, 其间移液器校准引入的不确定度见表 2。吸取标准工作液使用了移液器 9 次, 因此计入 9 次温度引起的不确定度, 合成标准系列管配制过程引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{s2}}) = \sqrt{3 \times (2.5 \times 10^{-3})^2 + 6 \times (1.5 \times 10^{-3})^2 + 9 \times (6.0 \times 10^{-4})^2} = 0.006 \text{ 0}。$

表2 标准系列管配制过程量具校准引入的不确定度

Table 2 Calibration uncertainty of gauges in preparation of standard series tubes

量具	使用次数	相对扩展不 确定度($k=2$)/%	相对标准 不确定度
200 μL 量程移液器	3	0.5	2.5×10^{-3}
1 mL 量程移液器	6	0.3	1.5×10^{-3}

(5) 合成标准溶液制备过程引入的相对不确定度: 综合计算标准品纯度、标准品称量、标准工作液配制、标准系列管配制 4 部分的相对不确定度分量, 合成标准溶液制备引起的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(S) = \sqrt{u_{\text{rel}}(P)^2 + u_{\text{rel}}(m_s)^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{s1}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{s2}})^2} = \sqrt{(2.9 \times 10^{-3})^2 + (1.07 \times 10^{-2})^2 + (2.5 \times 10^{-3})^2 + (6.0 \times 10^{-3})^2} = 0.012 \text{ 9}。$

2.2.2 样液制备引入的不确定度

(1) 样品称量引入的不确定度: 用称取标准品同一万分之一天平准确称取 103.5 mg 乳粉试样。已知该天平完成一次 0~1 g 范围内的称量(去皮+称样)引起的不确定度 $u(m_2) = 0.216 \text{ mg}$, 则此次称量的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_t) = \frac{0.216 \text{ mg}}{103.5 \text{ mg}} = 0.002 \text{ 1}。$

(2) 配制样品待测液引入的不确定度: 样品溶液定容与稀释使用了 1 次 100 mL 容量瓶、1 次 1 mL 量程移液器、1 次 10 mL 单标试管, 由各自的校准证书查得其在 20 °C 时容量校准的扩展或相对扩展不确定度, 计算得到各自的相对标准不确定度, 见表 3。计入 3 次温度引起的不确定度, 则合成相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{t1}}) = \sqrt{(2.0 \times 10^{-4})^2 + (1.5 \times 10^{-3})^2 + (5.0 \times 10^{-4})^2 + 3 \times (6.0 \times 10^{-4})^2} = 0.002 \text{ 1}。$

表3 样品待测液配制过程量具校准引入的不确定度

Table 3 Calibration uncertainty of gauges in preparation of sample test solution

量具	使用次数	扩展/相对扩展 不确定度($k=2$)	标准不确定度/mL	相对标准 不确定度
100 mL 单标容量瓶	1	0.04 mL	0.02	2.0×10^{-4}
1 mL 量程移液器	1	0.3%	0.001 5	1.5×10^{-3}
10 mL 单标试管	1	0.01 mL	0.005	5.0×10^{-4}

(3) 配制试样系列管引入的不确定度: 用 1 mL 量程移液器吸取 0.1, 0.2, 0.3 mL 试样待测液至离心管, 补水至 0.5 mL, 移液器校准引入的不确定度见表 3。吸取样液使用了移液器 3 次, 计入 3 次温度引起的不确定度, 合成试样系列管配制引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{t2}}) = \sqrt{3 \times (1.5 \times 10^{-3})^2 + 3 \times (6.0 \times 10^{-4})^2} = 0.002 \text{ 9}。$

(4) 合成样液制备过程引入的相对不确定度: 综合计算样品称量、样品待测液配制、试样系列管配制 3 部分的相对不确定度分量, 得到样液制备引起的合成相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(T) = \sqrt{u_{\text{rel}}(m_t)^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{t1}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{t2}})^2} = \sqrt{(2.1 \times 10^{-3})^2 + (2.1 \times 10^{-3})^2 + (2.9 \times 10^{-3})^2} = 0.004 \text{ 2}。$

2.2.3 接种微孔板引入的不确定度 使用 200 μL 量程移液器, 每孔接种 150 μL 含鼠李糖乳杆菌的叶酸测定用培养基和 150 μL 标准系列管或试样系列管。由表 2 可知, 该 200 μL 量程移液器校准引入的相对标准不确定度为 2.5×10^{-3} 。标准管每个点设 3 个平行孔, 试样管每个梯度设 2 个平行孔, 共接种 36 孔, 每孔使用 2 次移液器, 计入 72 次温度引起的不确定度, 则接种微孔板过程引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(I) = \sqrt{72 \times (2.5 \times 10^{-3})^2 + 72 \times (6.0 \times 10^{-4})^2} = 0.021 \text{ 8}。$

2.2.4 拟合标准曲线引入的不确定度 试验原理是利用

鼠李糖乳杆菌的生长速率与环境中叶酸含量成正比,通过检测菌液浊度可反映培养基中初始叶酸含量。理想状态以叶酸初始含量为横轴,吸光度为纵轴建立的标准曲线应为直线,但由于培养过程中叶酸不断消耗,乳杆菌产生的有害代谢物不断累积,实际的生长曲线会逐渐趋于平缓,因此将标准曲线拟合成二次方程较为符合实际情况,具体数据见表 4,得回归方程 $Y = -232.52x^2 + 22.775x + 0.1821$, $R^2 = 0.9974$ 。

先将二次曲线方程转化成一次直线方程^[16]:

$Y = -232.52x^2 + 22.775x + 0.1821 = -232.52(x - 0.0490)^2 + 0.739$,令 $Z = (x - 0.0490)^2$,则原方程可以转化为 $Y = aZ + b = -232.52Z + 0.739$,斜率 $a = -232.52$,截距 $b = 0.739$,标准曲线校准点吸光度值残差的标准差:

$$S_e = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - (aZ_i + b)]^2}{n - 2}}, \quad (2)$$

式中:

n ——标准系列管孔数;

Y_i ——仪器测得的各标准系列管吸光度值(即表 4

表 4 标准曲线试验数据

Table 4 Standard curve experimental data

每孔叶酸标准品含量/ng	吸光度值			
	A_1	A_2	A_3	$\bar{A}$
0.000 0	0.190	0.186	0.189	0.188
0.001 5	0.211	0.210	0.215	0.212
0.003 0	0.239	0.228	0.236	0.234
0.006 0	0.318	0.315	0.328	0.320
0.009 0	0.384	0.369	0.390	0.381
0.012 0	0.423	0.413	0.421	0.419
0.015 0	0.460	0.448	0.477	0.462
0.018 0	0.511	0.519	0.523	0.518
0.024 0	0.598	0.591	0.596	0.595
0.030 0	0.658	0.667	0.647	0.657

表 5 标准曲线各校准点叶酸含量离均差及吸光度值残差

Table 5 Mean deviation of folate and residual absorbance value at each calibration point

Z_i	$(Z_i - \bar{Z})^2$	$aZ_i + b$	$[Y_i - (aZ_i + b)]^2$		
0.002 401	0.000 000 87	0.180 719	0.000 086	0.000 028	0.000 069
0.002 256	0.000 000 62	0.214 377	0.000 011	0.000 019	0.000 000
0.002 116	0.000 000 42	0.246 988	0.000 064	0.000 361	0.000 121
0.001 849	0.000 000 14	0.309 071	0.000 080	0.000 035	0.000 358
0.001 600	0.000 000 02	0.366 968	0.000 290	0.000 004	0.000 530
0.001 369	0.000 000 01	0.420 680	0.000 005	0.000 059	0.000 000
0.001 156	0.000 000 10	0.470 207	0.000 104	0.000 493	0.000 046
0.000 961	0.000 000 26	0.515 548	0.000 021	0.000 012	0.000 056
0.000 625	0.000 000 71	0.593 675	0.000 019	0.000 007	0.000 005
0.000 361	0.000 001 23	0.655 060	0.000 009	0.000 143	0.000 065

中 $A_1 \sim A_3$ 数值);

$aZ_i + b$ ——由标准曲线公式算得的理论吸光度值(见表 5)。

由标准曲线拟合引入的不确定度:

$$u(c) = \frac{S_z}{|a|} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{C} - \bar{Z})^2}{\sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}}, \quad (3)$$

式中:

p ——试样系列管孔数;

C ——测得的各试样系列管叶酸含量转换为 Z 后的平均值;

Z_i ——各标准系列管叶酸含量转换为 Z 后的值;

$\bar{Z}$ ——各标准系列管叶酸含量转换为 Z 后的平均值(见表 5)。

将 6 个试样孔所得的吸光值代入一次方程中,得到相应 Z 的值,取其平均数可得 $\bar{C} = 0.001\ 019$,结合表 5 可

得, $u(c) = \frac{0.010\ 5}{232.52} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{30} + \frac{(0.001\ 019 - 0.001\ 469)^2}{0.000\ 004\ 37}} = 2.24 \times 10^{-5}$, $u_{\text{rel}}(c) = \frac{u(c)}{C} = \frac{2.24 \times 10^{-5}}{1.02 \times 10^{-3}} = 0.022\ 0$ 。

2.2.5 酶标仪测定引入的不确定度 多功能酶标仪检定证书给出的吸光度示值校准的相对扩展不确定度 $U = 0.012(k = 2)$,则使用酶标仪引入的相对不确定度

$$u_{\text{rel}}(E) = \frac{0.012}{2} = 0.006。$$

2.2.6 测量重复性引入的不确定度 重复性引入的不确定度适合按 A 类不确定度评定方法计算。对该乳粉样品进行 10 次平行测定,使用贝塞尔公式计算标准偏差 $S(R) = 7.471\ 9$ 。标准要求报告取两个平行结果的平均值,因此重复性引入的不确定

$$u(R) = \frac{S(R)}{\sqrt{2}} = 5.283\ 4$$
,相对不确定度 $u_{\text{rel}}(R) = \frac{u(R)}{X} = \frac{5.283\ 4}{282.33} = 0.018\ 7$ 。

2.3 合成标准不确定度

综上,接种微孔板、拟合标准曲线和测量重复性三者对试验结果影响较大;接种微孔板引入的不确定度主要来自所使用移液器的校准;拟合标准曲线引入的不确定度主要与微生物生长状况的分散性相关;测量重复性引入的不确定度与试验仪器精密度、人员操作稳定性及微生物生长状况的分散性相关,其中后者起关键作用。

将各不确定度分量综合计算,得到此次叶酸测定的合成标准不确定度

$$u(X) = X \times u_{\text{rel}}(X) = X \times \frac{\sqrt{u_{\text{rel}}(S)^2 + u_{\text{rel}}(T)^2 + u_{\text{rel}}(I)^2 + u_{\text{rel}}(C)^2 + u_{\text{rel}}(E)^2 + u_{\text{rel}}(R)^2}}{33} = 282. \times \frac{\sqrt{0.012^2 + 0.004^2 + 0.021^2 + 0.022^2 + 0.006^2 + 0.018^2}}{33} = 11.04 \mu\text{g}/100 \text{ g}.$$

2.4 扩展不确定度

该检测结果属于正态分布,当置信水平为95%时,包含因子 $k=2$,扩展不确定度 $U=u(X) \times k=11.04 \times 2=22.08 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。此次测定的乳粉样品中叶酸含量可表示为 $(282.33 \pm 22.08) \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。

3 结论

微孔板法的引入是国标叶酸测定方法的一次优化,其相较于传统的试管法,首先成倍减少了培养基的用量,降低了试验成本。其次,标准管和试样管改用过滤灭菌替代高压灭菌,避免了叶酸受热分解影响检测结果。再次,使用一次性微孔板代替试管,一方面避免了试管因未洗净带入残留造成不良影响,一方面微孔板可以直接使用酶标仪一次性读取全部孔结果,避免了使用分光光度计时逐管测定频繁操作造成的干扰。但新方法有其相应的不确定性。

试验表明,该样品中叶酸含量可表示为 $(282.33 \pm 22.08) \mu\text{g}/100 \text{ g}$ (置信度95%)。新增的接种微孔板步骤以及拟合标准曲线、测量重复性,三者是不确定度的主要来源。接种微孔板过程需频繁使用移液器,选用质量较好的移液器能有效降低该不确定度分量。后二者涉及鼠李糖乳杆菌的培养,而微生物的生长状况分散性较大,其影响因素主要有:所用菌株的活性、样品基质所含杂质、培养基的质量、培养条件如温度、时长^[17]。因此,选用性状稳定、正规来源的新鲜标准菌株,确保待测样品不含除叶酸外影响鼠李糖乳杆菌生长的其他成分,选用正规厂商培养基并严格按照要求配制,使用经检定的恒温培养箱,在适宜的菌液浓度(孔底未出现沉淀)时收取等措施能尽可能降低微生物因素引起的不确定度。标准品和样品的称量、稀释,标准溶液和样液的配制,以及酶标仪的仪器误差是不确定度的次要来源,可通过使用精密度更高的仪器并注意维护保养、定期检定以减小该部分的影响。

参考文献

- [1] 王宏亮. 维生素的概述及研究进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(12): 40-45.
WANG H L. Overview and research progress of vitamins [J]. Clinical Medication Journal, 2022, 20(12): 40-45.
- [2] SHULPEKOVA Y, NECHAEV V, KARDASHEVA S, et al. The concept of folic acid in health and disease[J]. Molecules, 2021, 26(12): 3731.
- [3] BARUA S, KUIZON S, JUNAID M A. Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease[J]. Journal of Biomedical Science, 2014, 21(S3): 77.
- [4] 王安妮, 丁新, 冯欣. 孕期叶酸水平对子代生长发育影响的研究进展[J]. 中国药杂志, 2020, 55(14): 1138-1142.
WANG A N, DING X, FENG X. The effects of folic acid in fetuses and newborns[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2020, 55(14): 1138-1142.
- [5] 解楠, 宋妍, 陈若桐, 等. 浅谈我国婴幼儿配方食品系列安全标准新、旧变化[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(3): 43-47.
JIE N, SONG Y, CHENG R T, et al. Discussion on changes of safety standards for infant formula food in China[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(3): 43-47.
- [6] ELÍSABET M T, ANUNCIACIÓN E M, ISABEL D M. High-performance liquid chromatography with fast-scanning fluorescence detection and post-column on-line photoderivatization for the analysis of folic acid and its metabolites in vegetables[J]. Microchemical Journal, 2017, 133: 333-345.
- [7] HALILIBRAHIM U A, SONGÜL U, SELIM E. Development of a new methodology for determination of vitamin B₉ at trace levels by ultrasonic-assisted cloud point extraction prior to HPLC[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(3): 799-808.
- [8] NOURRUDIN W A, NADA S A, MAHA M A, et al. Development and validation of spectrophotometric and high-performance thin-layer chromatographic methods for the determination of folic acid in the presence of its impurities (degradation products)[J]. Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2018, 31(5): 367-376.
- [9] 王博伦, 顾丰颖, 刘子毅, 等. 食品中叶酸测定方法的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 294-300.
WANG B L, GU F Y, LIU Z Y, et al. Advances in methods for the determination of folate in foods[J]. Food Science, 2020, 41(9): 294-300.
- [10] PAKSOY N, ALTUN SKILIÇ, DURMAZ H, et al. Determination of vitamin B₉ levels in the milk of brown swiss and simmental cows using the ELISA method[J]. South African Journal of Animal Science, 2019, 48(6): 1110-1114.
- [11] 李江, 严家俊, 蔡艳, 等. 酶联免疫法快速检测奶粉中的叶酸[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(10): 37-38.
LI J, YANG J J, QI Y, et al. Rapid detection of folic acid in milk powder by enzyme linked immunosorbent assay[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(10): 37-38.

(下转第119页)

- 2013, 37(1): 77-81.
- CAO X H, HU J T. Continuous automatic positioning for reclaiming point of grab ship unloader based on 3D perception technology [J]. Journal of Wuhan University of Technology (Transportation Science & Engineering), 2013, 37(1): 77-81.
- [11] 赵建平, 汪永超, 张莹, 等. 智能调料机设计与研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 154-157.
- ZHAO J P, WANG Y C, ZHANG Y, et al. Design of automatic seasoning-discharging machine[J]. Food & Machinery, 2014, 30(5): 154-157.
- [12] 蔡威. 全自动垃圾搬运起重机械控制系统的若干关键技术研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2014: 16-26.
- CAI W. Research of key technologies for garbage handling crane's control system[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2014: 16-26.
- [13] 钟星, 邵辉, 叶贤成. 多障碍物环境下挖掘机的连续避障轨迹规划[J]. 计算机工程与科学, 2018, 40(7): 1 310-1 315.
- ZHONG X, SHAO H, YE X C. Trajectory planning with continuous obstacle avoidance for an excavator in multi-obstacle environment[J]. Computer Engineering & Science, 2018, 40(7): 1 310-1 315.
- [14] 陆成浩. 基于双目视觉的智能化抓斗卸船机关键技术研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2020: 44-79.
- LU C H. Research on key technologies of intelligent grab ship unloader based on binocular vision[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2020: 44-79.
- [15] 张鑫. 大曲清香白酒不同发酵容器酿酒情况对比[J]. 酿酒, 2020, 47(1): 77-78.
- ZHANG X. Comparison of Fen flavor liquor making situation in different fermentative vessels [J]. Liquor Making, 2020, 47(1): 77-78.
- [16] 赵景龙, 韩兴林, 杨海存, 等. 清香型大曲白酒地缸发酵机理[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 81-84.
- ZHAO J L, HAN X L, YANG H C, et al. Preliminary research on fermentation mechanization of Fen-flavor's ground-pot[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 81-84.
- [17] 李忠虎, 薛婉婷, 吕鑫, 等. 基于图像融合的风电塔筒边缘检测及提取方法[J]. 国外电子测量技术, 2022, 41(3): 90-95.
- LI Z H, XUE W T, LU X, et al. Edge detection and extraction method of wind turbine tower based on image fusion[J]. Foreign Electronic Measurement Technology, 2022, 41(3): 90-95.
- [18] 张苏楠. 生猪异常行为多源监测及其信息融合方法的研究与应用[D]. 太原: 太原理工大学, 2020: 26-29.
- ZHANG S N. Information fusion method research and application on multi-source monitoring of porcine abnormal [D]. Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2020: 26-29.
- [19] 王书宇, 田建艳, 蔡文站, 等. 基于孔特征的弱纹理堆叠工件识别[J]. 计算机工程与应用, 2022, 58(3): 282-288.
- WANG S Y, TIAN J Y, CAI W Z, et al. Recognition of stacked texture-less workpieces based on hole features [J]. Computer Engineering and Applications, 2022, 58(3): 282-288.
- [20] KLEFF S, LI N. Robust motion planning in dynamic environments based on sampled-data Hamilton-Jacobi reachability[J]. Robotica, 2020, 38(12): 2 151-2 172.
- [21] RICHARD S, ROMAN R. The role of a behavioural model for the virtual commissioning of robotic manufacturing systems [J]. Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology, 2022, 30(50): 45-52.
-
- (上接第 99 页)
- [12] 陈琼, 王子威, 辛博, 等. 微生物法测定特殊食品中叶酸含量的研究[J]. 食品科技, 2023, 48(1): 240-245.
- CHENG Q, WANG Z W, XIN B, et al. Determination of folate content in special foods by microbial method[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(1): 240-245.
- [13] 张慧, 吴环, 黄伟乾, 等. 微生物法快速检测婴幼儿配方乳粉中叶酸含量[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(5): 66-69.
- ZAHNG H, WU H, HUANG W Q, et al. Rapid microbiological methods detecting the content of folic acid in infant formula milk powder[J]. Food Research and Development, 2015, 36(5): 66-69.
- [14] AMIRAH M G, MATHILDE L, LUDOVIC C, et al. Stability of folic acid under several parameters [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 93: 419-430.
- [15] 翟洪稳, 范素芳, 王娟, 等. 测量不确定度在食品检验中的应用及进展[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 314-320.
- ZHAI H W, FANG S F, WANG J, et al. Recent progress in measurement uncertainty and its application in food inspection and detection[J]. Food Science, 2021, 42(5): 314-320.
- [16] 马天菊. 火花源原子发射光谱法测定铸铁中碳的不确定度评定[J]. 冶金分析, 2007(9): 79-82.
- MA T J. Spark source atomic emission spectrometry determination uncertainty evaluation of carbon in cast iron [J]. Metallurgical Analysis, 2007(9): 79-82.
- [17] 田浩, 王志伟, 顾文佳, 等. 微生物法测定食品中叶酸、泛酸、生物素、维生素 B₁₂ 注意事项和实践[J]. 中国标准化, 2018(17): 127-130.
- TIAN H, WANG Z W, GU W J, et al. Matters needing attention and practical experience for microbiological method determination of folic acid, pantothenic acid, biotin and vitamin B₁₂ in foods[J]. China Standardization, 2018(17): 127-130.