

微生物法测定米粉中维生素 B₆ 含量不确定度评估

熊娟¹, 蔡大川^{1*}, 张燕忠², 陈敏儿¹, 黄璇莹¹

(1. 中国广州分析测试中心, 广东省化学危害应急检测技术重点实验室 510070; 2. 广东省汕头市潮汕工夫茶研究所)

摘要: 应用微生物法测定米粉样品中维生素 B₆ 含量, 并从多个方面分析测量的不确定度。试验结果表明: 相对合成标准不确定度为 0.01393, 扩展不确定度为 0.1653, 测量结果为 (5.932 ± 0.1653) μg/hg; 影响维生素 B₆ 测定结果的最主要不确定度分量为微量移液枪容差。

关键词: 微生物法; 维生素 B₆; 不确定度; 评估

DOI: 10.13651/j.cnki.fjnykj.2017.04.007

Uncertainty evaluation in determination of vitamin B₆ in rice flour by microbiological method

XIONG Juan¹, CAI Da-chuan^{1*}, ZHANG Yan-zhong², CHEN Min-er¹, HUANG Xuan-ying¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, China National Analytical Center 510070; 2. Institute of Chaoshan Kungfu Tea in Shantou)

Abstract: In this paper, the content of vitamin B₆ in rice flour samples was determined by microbiological method, and the uncertainty of measurement was analyzed from several aspects. The results showed that, the relative synthetic standard uncertainty was 0.01393, the expanded uncertainty was 0.1653, and the result was (5.932 ± 0.1653) μg/100 g. The main uncertainty component affecting the determination results of vitamin B₆ is the capacity difference within micro pipette tips.

Key words: Microbial method; vitamin B₆; uncertainty; assessment

维生素 B₆ 是婴幼儿米粉中的重要营养物质, 国家标准中有严格的限量, 但由于其含量较低, 常用的高效液相法、气相色谱法等由于检出限较高, 难以准确测量其含量, 微生物法因其灵敏度高, 被国家标准纳入国家仲裁测定法。但微生物法操作繁琐、菌株生长不确定性强, 使得测定结果受多种因素的影响, 最新版国家标准 GB 5009.154—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B₆ 的测定》中第二法规定实验室可采用商品化的试剂盒替代传统标准曲线制定, 以减少试验中的标准误差^[1]。

商品试剂盒性质稳定, 但是测量过程中还是会不可避免地产生不确定度^[2-4]。因此, 不确定度的测量也越来越被大家所重视^[5-7]。本文根据食品安全国家标准 GB 5009.154—2016, 采用微生物法测定米粉样品中维生素 B₆ 含量, 分析试验过程中各种影响因素, 并根据《化学分析中不确定度的评估指南》CNAS—GL06 对不确定的来源进行分析和计算, 得出扩展不确定度^[8]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

VitaFast@Vitamin B₆ 检测试剂盒, 购于拜发分析系统销售(北京)有限公司, 用于定量检测食品、药品和动物饲料中的维生素 B₆ 含量; SHP—250 型生化培养箱, 购于广东环凯微生物科技有限

收稿日期: 2017-04-10

作者简介: 熊娟, 女, 1985年生, 助理研究员。

* 通讯作者: 蔡大川, 男, 1973年生, 高级工程师
(E-mail: cai-dachuan@21cn.com)。

公司, 广泛用于培养试验等; Thermo 酶标检测仪 MK3, 购于赛默飞世尔(上海)仪器有限公司, 用于测量板孔吸光度值。

1.2 试验方法

称取 2.5 g 均质米粉样品放入 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL pH 值为 4.5 的柠檬酸盐缓冲液, 摇匀。加入 25 mg 马铃薯酸性磷酸酶, 摇匀。37℃ 暗处孵育 1 h, 不时振荡。精确加入蒸馏水 100 mL, 摇匀。95℃ 水浴提取 30 min, 其间振荡至少 5 次, 确保离心管紧闭。迅速冷却到 30℃ 以下。离心后根据浓度范围, 确定是否在 2 mL 无菌小试管中进一步稀释上清液。

加入 10 mL 无菌水至试剂盒中维生素 B₆ 培养基瓶中, 拧紧培养基瓶, 摇匀。95℃ 加热 5 min, 其间振荡至少 2 次, 迅速冷却至室温。使用 0.2 μm 无菌滤膜过滤培养基至无菌离心管中。

取 6 个无菌管, 按照试剂盒说明书准备以下浓度标准品溶液: 0、0.002、0.004、0.006、0.008、0.012 mg/hg。样品提取稀释倍数 1:40 已经包含在标准曲线中。

取出需要数量的微孔板条并在板上固定, 移取 150 μL 培养基至各微孔中, 然后移取 150 μL 各标准品或稀释的样品至指定的微孔中。封闭微孔板条后在 30℃ 条件下暗处孵育 44~48 h, 用酶标仪在 630 nm 条件下读取吸光度。

1.3 数学模型

米粉中维生素 B₆ (μg/hg) 含量按下式计算:

维生素 B₆ (X) = 样品在标准曲线读取的浓度 (C) × 稀释倍数 (n) × 0.822 / 样品量 (m)

则 X 的相对标准不确定度为:

$$U_{rel(X)} = \sqrt{[U_{rel(C)}]^2 + [U_{rel(n)}]^2 + [U_{rel(m)}]^2}$$

1.4 不确定度分量评定

(1) 影响样品在标准曲线读取的维生素 B₆ 浓度 (C) 测定的不确定度分量包括: 标准品纯度引入的不确定度、微量移液器自身容差引入的不确定度、样品培养液吸光度值的不确定度、样品测定重复性的不确定度。

(2) 影响样品称量结果 (m) 不确定度的分量为天平自身精密密度。

(3) 影响样品稀释 (n) 定容的不确定度分量包括: 移液器及容量瓶自身容差引入的不确定度、试验环境温度变化引入的不确定度。

2 结果与分析

2.1 样品维生素 B₆ 含量测定引入的不确定度

2.1.1 标准品纯度的不确定度 维生素 B₆ 标准品检定证书给出的纯度为不小于 99%, 假设其纯度在 99%~100% 范围内服从矩形分布, 中位值为 99.5%, 因此其相对标准不确定度 $U_{rel(p)} = 0.005/\sqrt{3} = 0.002887$

2.1.2 微量移液器的不确定度 根据 JJG 646—2006 规定, 20℃ 时 20~200 μL 量程的测量范围内最大允许差为 ±3.0 μL, 取均匀分布, 则由此带来的不确定度为:

$$U_v = \frac{3.0}{\sqrt{3}} = 1.732 \mu\text{L}$$

该移液器在本试验中的加样体积为 150 μL, 其相对标准不确定度为:

$$U_{rel(v)} = \frac{1.732}{150} = 0.01155$$

2.1.3 样品培养液吸光度值的不确定度 样品培养液吸光度值的不确定度由重复测定所得吸光度值的标准差决定, 将最终样品溶液平行培养 12 管, 测定每管培养液的吸光度值, 结果如表 1 所示。

表 1 样品培养液吸光度值重复测定结果

测定次数	吸光度值 A	测定次数	吸光度值 A
1	0.402	7	0.401
2	0.410	8	0.411
3	0.396	9	0.405
4	0.403	10	0.406
5	0.409	11	0.405
6	0.399	12	0.408

根据贝塞尔公式计算由随机效应导致的标准不确定度:

$$U_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} = 0.004221$$

相对标准不确定度:

$$U_{rel(d)} = \frac{U_d}{\bar{d}} = 0.01045$$

2.1.4 测定重复性的不确定度 在重复性条件下, 对该样品进行 12 次独立测量 (n=12), 结果如表 2。

表 2 低聚糖重复测定结果

测定次数	样品测量结果 ($\mu\text{g}/\text{hg}$)	测定次数	样品测量结果 ($\mu\text{g}/\text{hg}$)
1	5.936	7	5.908
2	5.941	8	5.897
3	5.912	9	6.012
4	5.923	10	5.955
5	5.923	11	5.912
6	5.914	12	5.934

根据贝塞尔公式计算由随机效应导致的标准不确定度：

$$U_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (g_i - \bar{g})^2}{n-1}} = 0.002256$$

相对标准不确定度计算公式为：

$$U_{\text{rel}(g)} = \frac{U_g}{g} = 0.01033$$

样品维生素 B₆ 浓度测定引入的相对标准不确定度为：

$$U_{\text{rel}(c)} = \sqrt{[U_{\text{rel}(p)}]^2 + [U_{\text{rel}(v)}]^2 + [U_{\text{rel}(d)}]^2 + [U_{\text{rel}(g)}]^2} = 0.01238$$

2.2 样品称量引入的不确定度

称取样品使用的电子天平精密密度为 0.001 g，根据天平检定证书，其最大允许误差为 ± 0.001 g。本试验中使用减法称取样品 2.500 g，共称重 2 次，即空盘质量和总质量，天平线性按矩形分布计算，样品称重的不确定度：

$$U_m = \frac{\sqrt{2} \times 0.001}{\sqrt{3}} = 0.0008165$$

相对标准不确定度

$$U_{\text{rel}(m)} = \frac{U_m}{m} = 0.0003266$$

2.3 样品稀释定容引入的不确定度

2.3.1 玻璃器皿允差引入的不确定度 处理后的样品需要转移至 100 mL 容量瓶中，《常用玻璃量器》JJG 196—2006 规定 100.0 mL A 级容量瓶的标准不确定度包括玻璃量器的容量允差 $U(V_A)$ 和温度变化产生的误差 $U(V_C)$ ，20℃时 100 mL 容量瓶（A 级）的容量最大允许误差为 ± 0.10 mL，按照均匀分布 ($K = \sqrt{3}$)，设温度变化 $\pm 3^\circ\text{C}$ 、水膨胀系数在 20℃时， $\alpha = 2.1 \times 10^{-4}$ 。故样品定容体

积引入的不确定度 $U_{v1} = 0.06854$ ；样品定容体积引入的相对标准不确定度 $U_{\text{rel}(V1)} = 0.0006854$ 。

2.3.2 温度变化引起的不确定度 假设温差为 $\pm 15^\circ\text{C}$ ，则由此导致的体积 V 的分散区间半宽度为： $\Delta V = 100 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 15 = 0.32$ mL，按均匀分布，则由温度变化引入的不确定度为：

$$U_{V100} = \frac{0.32}{\sqrt{3}} = 0.18 \text{ mL}$$

由 100 mL 容量瓶引入的标准不确定度为：

$$U_v = \sqrt{0.058^2 + 0.010^2 + 0.18^2} = 0.1932 \text{ mL}$$

相对标准不确定度为：

$$U_{\text{rel}(v)} = \frac{U_v}{V} = \frac{0.1932}{100} = 0.001932$$

样品稀释定容引入的相对标准不确定度为：

$$U_{\text{rel}(n)} = \sqrt{[U_{\text{rel}(v1)}]^2 + [U_{\text{rel}(v)}]^2} = 0.002050$$

2.4 维生素 B₆ 测定的不确定度分量

维生素 B₆ 测定的不确定度分量见表 3。假设样品已经经过充分均匀，忽略均匀性带来的不确定度分量，试样中维生素 B₆ 的相对合成标准不确定度为：

$$U_{\text{rel}(x)} = \sqrt{[U_{\text{rel}(c)}]^2 + [U_{\text{rel}(m)}]^2 + [U_{\text{rel}(n)}]^2} = 0.01393$$

表 3 维生素 B₆ 含量测定的不确定度分量

序号	不确定度分量	不确定度来源	相对标准不确定度
1	$U_{\text{rel}(c)}$	样品在标准曲线读取的维生素 B ₆ 浓度测定的不确定度	0.01238
2	$U_{\text{rel}(m)}$	样品称量结果不确定度	0.0003266
3	$U_{\text{rel}(n)}$	样品稀释定容的不确定度	0.002050

2.5 扩展不确定度及测定结果

根据公式 $U_{\text{rel}(x)} = \frac{U_x}{X}$ ，则合成不确定度为： $U_{(x)} = U_{\text{rel}(x)} \cdot x$ ，扩展不确定度可由合成标准不确定度乘以包含因子得到，即 $U_x = k \cdot U_{(x)}$ ；取 $k = 2$ ，根据计算得到样品米粉中维生素 B₆ 含量为 5.932 $\mu\text{g}/\text{hg}$ ，则米粉中维生素 B₆ 含量的扩展不确定度为：

$$U_{(x)} = k U_{\text{rel}(x)} X = 2 \times 0.01393 \times 5.932 = 0.1653$$

米粉中维生素 B₆ 含量为：

$$X = (5.932 \pm 0.1653) \mu\text{g}/\text{hg} \quad (k=2)$$

3 结论

本试验采用微生物法测定米粉样品中维生素 B₆ 的含量, 结果为 $(5.932 \pm 0.1653) \mu\text{g}/\text{hg}$, $k=2$ 。由于本试验采用商品化的试剂盒, 在接种菌种数量、菌种活力等方面无法测定其不确定度, 所以在标准曲线读取的维生素 B₆ 浓度 (C)、样品称量结果 (m)、样品稀释 (n) 定容等几个方面进行不确定度评定, 结果表明: 不确定度的主要来源样品在标准曲线读取的维生素 B₆ 浓度测定, 其中最主要来自微量移液器容差的不确定度。所以在试验过程中应注意尽量减小微量液体转移的偏差, 注意对微量移液器进行定期维护和校准。

参考文献:

- [1] 张艳, 王甲威, 赵相霞. 微生物法测定维生素的质量控制 [J]. 中国乳品工业, 2014, 42 (8): 54-57.
- [2] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示 [S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.
- [3] 李慎安. 化学实验室测量不确定度 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [4] 国家质量技术监督局计量司组. 测量不确定度评定与表示指南 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2000.
- [5] 郝晓莉, 赵瑛博, 陈芳芳. 分光光度法测定白菜中亚硝酸盐的不确定度评定 [J]. 食品科学, 2013, 34 (6): 208-210.
- [6] 牛华, 牛之瑞, 冯雷. 高效液相色谱法测定辣椒粉中罗丹明 B 的测量不确定度评估 [J]. 食品科学, 2014, 35 (8): 165-168.
- [7] 王吉祥, 张学忠, 王亚. 气相色谱法和气相色谱-质谱法测定茶叶中联苯菊酯的不确定度评定 [J]. 食品科学, 2014, 35 (12): 200-203.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1059.1 2012 测量不确定度评定与表示 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2012.

(责任编辑: 刘新永)

《福建农业科技》版权声明

凡向本刊投稿者, 如无特殊声明, 稿件一经采用, 其专有出版权和网络传播权即授予本刊, 并许可本刊在本刊网站或本刊授权的网站上传播。作者稿酬和著作权使用费在刊发后一次性支付。对于上述合作条件若有异议, 烦请来稿时声明, 本刊将适当处理; 未作声明者, 本刊将视为同意。同时, 要求投寄给本刊的稿件 (论文、图表、照片等) 没有侵犯他人著作权或其他权利的内容, 并且文责自负。谢谢合作, 并致诚挚敬意。