

不同定量方法在婴儿配方奶粉中维生素 B12 测量中的不确定度评估



王许欣, 李晓敏*, 张庆合

中国计量科学研究院, 北京 100029

【摘要】 本文以婴儿配方奶粉中的维生素 B12 测量为例, 开展了标准加入法、标准加入同位素稀释质谱法、单点同位素稀释质谱法和校准曲线同位素稀释质谱法四种定量方法的不确定度评估。基于 ISO-GUM 指南等不确定度评估方法对四种定量方法进行不确定度量化评估, 发现方法重复性和曲线拟合引入的不确定度为主要不确定度来源, 且标准加入法评估得到的不确定度明显大于同位素内标法评估得到的不确定度。通过不同定量方法的比较研究, 可以更有效地选择定量方式, 提高测量精度。

【关键词】 不确定度评估; 同位素内标校准法; 标准加入法; 维生素 B12

DOI: 10.12338/j.issn.2096-9015.2022.0089

【引用本文】 王许欣, 李晓敏, 张庆合. 不同定量方法在婴儿配方奶粉中维生素 B12 测量中的不确定度评估 [J]. 计量科学与技术, 2022, 66(9): 23-27, 46.

Uncertainty Evaluation of Different Quantitative Calibration Methods for the Determination of Vitamin B12 in Infant Formula

WANG Xuxin, LI Xiaomin, ZHANG Qinghe

National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

Corresponding author: LI Xiaomin, Email: lixm@nim.ac.cn

【Abstract】 In this study, take measurement of the vitamin B12 in infant formula as an example, measurement uncertainty was evaluated through four calibration methods, including standard addition method, standard addition-isotope dilution mass spectrometry method, single point isotope dilution mass spectrometry method, and standard calibration curve isotope dilution mass spectrometry method. The uncertainty evaluation of the four quantitative methods was assessed based on the ISO-GUM guidelines and other uncertainty assessment methods. The uncertainties introduced by the method of repeatability and curve fitting were the primary sources of uncertainty. Furthermore, the uncertainties obtained by the standard addition method were significantly more significant than those obtained by the isotope internal standard method. The comparative study of different quantification methods can lead to a more effective selection of quantification methods and improved measurement accuracy.

【Key words】 uncertainty evaluation, isotope internal standard method, standard addition method, vitamin B12

0 引言

化学测量是对目标成分赋值, 而测量结果与实际的真值之间存在一定的差距。测量不确定度可合理表征被测量值的分散性, 可评估检测准确性、可靠性。通过对测量不确定度的评估, 可明确测量结果的置信区间^[1-2]。测量结果的不确定度评估主要

包括样品制备以及样品处理、测量方法、溶液配制、校准标准物质等方面^[3]。定量方法不同, 操作步骤有差异, 引入的不确定度也不同。

质谱技术有较高的选择性和灵敏度, 是目前复杂基体中痕量化合物检测的首选, 但其基质效应 (Matrix Effect) 是影响定量准确性的重要因素^[4-6]。基质匹配校准、标准加入法 (SA) 和内标校准方法可

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2019YFC1604803)。

作者简介: 王许欣 (1997-), 中国计量科学研究院在读硕士研究生, 研究方向: 食品中维生素计量技术研究, 邮箱: wangxuxin0101@163.com; 通讯作者: 李晓敏 (1981-), 中国计量科学研究院副研究员, 研究方向: 食品质量安全与化学计量, 邮箱: lixm@nim.ac.cn。

有效减少基质效应^[6-11],对于内源性目标物的体系,由于缺乏匹配的空白基质,标准加入法和内标校准方法更为适用。对不同测量方法根据各自测量过程进行不确定度的评估,可找出影响测量准确性的主要来源。单点同位素稀释质谱法(SP-IDMS)主要评估了标准物质纯度、标准物质及内标称量不确定度、测量重复性不确定度^[12];校准曲线同位素稀释质谱法(SCC-IDMS)除以上不确定度外,还评估了校准曲线引入的不确定度^[13];标准加入法则采用最小二乘回归模型进行不确定度评估^[14]。

目前,对同一个测量体系,不同测量方法的不确定度比较研究较少。本文选用超高效液相色谱(UHPLC)结合QE plus Orbitrap质谱(MS)检测婴儿配方奶粉中的维生素B12(以氰钴胺为主要形式)体系,建立了标准加入法、标准加入同位素稀释质谱法(SA-IDMS)、单点同位素稀释质谱法和校准曲线同位素稀释质谱法四种定量方法。根据ISO-GUM指南^[15]、JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[1]及CNAS-GL006:2019《化学分析中不确定度的评估指南》^[16],对四种定量方法的测量不确定度进行详细对比分析,包括方法重复性、标准物质纯度、样品称量、曲线引入的不确定度等。通过不确定度来源分析和分量评定,掌握影响检测质量的关键步骤。

1 材料和方法

1.1 试剂

维生素B12标准物质氰钴胺(CNCbl, GBW(E) 100272, 纯度99.0%±0.8%, $k=2$), 购于中国计量科学研究院;¹³C₇CNCbl同位素内标溶液(浓度1.070 mg/L, 不确定度 $U=3%$, $k=2$)购于中国Bepure公司;甲醇(HPLC级)购于德国默克公司;甲酸和乙酸购于意大利Sigma公司;无水乙酸钠和甲酸铵购于中国Alfa Aesar公司;聚四氟乙烯滤膜(PTFE, 孔径0.2 μm, 厚度13 mm)购于美国PALL公司;Agilent Bond Elut Plexa固相萃取柱(填料200 mg, 柱体积6 mL)购于美国安捷伦科技有限公司;CNCbl和¹³C₇CNCbl的甲醇溶液浓度为1 mg/kg, 并在-20℃下储存;商用婴儿配方奶粉样品从中国北京市的超市购买。

1.2 仪器

采用Q-Exact Plus Orbitrap质谱仪和Thermo Vanquish超高效液相色谱系统(Thermo Fisher Scientific)对维生素B12进行检测和定量。该仪器配备

了加热电喷雾电离源(HESI),在正离子模式下,采用平行反应监测(PRM)。离子源参数设置如下:喷雾电压为4.50 kV,离子传输线温度为300℃,辅助气温度为450℃,鞘气流速为5.2 L/min,辅助气流速为1.6 L/min,反吹气流速为0, S lens RF水平为60。PRM采用17500 FWHM的分辨率;标准化碰撞能(NCE)分别设置为20 V、30 V和40 V;色谱柱为Acquity UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国, Waters);流动相为水(A相)和甲醇(B相)的混合物,其中含有甲酸(体积比0.1%)和甲酸铵(浓度10 mmol/L)。梯度洗脱从1%B开始,持续2分钟,然后在1分钟内线性增加至99%B,然后在0.5分钟内减少至1%B,并保持2.5分钟。流速为0.3 mL/min,进样体积为5 μL,柱温为40℃。

1.3 样品预处理

准确称量婴儿配方奶粉1.000 g于50 mL离心管中,加入适量¹³C₇CNCbl标准溶液,加入5 mL乙酸钠缓冲液(浓度25 mmol/L, pH=4),涡旋1 min并在37℃温水浴中震荡1 min混匀。再加入200 μL KCN(浓度10 mg/mL)溶液震荡混匀,置于100℃水浴中加热30 min。冷却至室温后在4℃下以12000 rpm/min的速度离心10 min,取出上清液。用尼龙滤膜过滤上清液,然后用SPE柱净化。首先用5 mL甲醇和5 mL水对SPE柱进行预平衡。将上清液注入柱中,然后用5 mL水洗涤,最后用1 mL甲醇洗脱两次。样品在40℃的氮气下干燥,氮吹后用0.5 mL甲醇复溶,使用PTFE滤膜过滤,上机检测。

1.4 校准方法

分别采用SA、SA-IDMS、SP-IDMS和SCC-IDMS四种定量方法测量婴儿配方奶粉样品中维生素B12的含量。

1.4.1 标准加入法(SA)

在SA方法中,在奶粉中梯度添加定量CNCbl。根据式(1)~(2)计算每个婴儿配方奶粉样品中CNCbl的质量浓度。

$$A_1 = K \times M \times M_s + b \quad (1)$$

$$M = \frac{|b|}{K \times M_s} \quad (2)$$

式中, M 是婴儿奶粉样品中CNCbl的质量浓度, μg/kg; A_1 是婴儿配方奶粉样品中测得的CNCbl峰面积; M_s 是婴儿配方奶粉样品的质量, kg; K 是校准曲线的斜率; b 是校准曲线的截距。

1.4.2 标准加入同位素稀释质谱法 (SA-IDMS)

将相同量的 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 标准溶液加入 SA 方法各个浓度梯度的样品,使校准曲线各点 CNCbl 和 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 的质量比在 1~4 之间。根据样品中 CNCbl 和 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 的质谱响应比与添加质量比绘制校准曲线。根据式(3)~(4)可计算每个婴儿配方奶粉样品中 CNCbl 的质量浓度。

$$\frac{A_1}{A'_1} = K \times \frac{M \times M_s}{M'_1} + b \quad (3)$$

$$M = \frac{|b| \times M'_1}{K \times M_s} \quad (4)$$

式中, A_1 是婴儿配方奶粉样品中测得的 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 峰面积; A'_1 是样品中测得的 CNCbl 峰面积; M'_1 是添加到婴儿配方奶粉样品中 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 的质量, μg ; M_s 是婴儿配方奶粉样品的质量, kg ; K 是校准曲线的斜率; b 是校准曲线的截距。

1.4.3 单点同位素稀释质谱法 (SP-IDMS)

在 SP-IDMS 方法中,预测样品中 CNCbl 的浓度,然后将 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 加入溶剂中, $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 与 CNCbl 的浓度比为 1:1。根据式(5)得出婴儿配方奶粉样品中 CNCbl 的质量浓度。

$$M = \frac{A_1/A'_1}{A_2/A'_2} \times \frac{M'_1}{M'_2} \times \frac{M_2}{M_s} \quad (5)$$

式中, A_1 是样品中测得的 CNCbl 峰面积; A'_1 是样品中测得的 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 峰面积; A_2 是标准溶液中测得

的 CNCbl 峰面积; A'_2 是标准溶液中测得的 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 峰面积; M'_1 是样品中的 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 的质量; M'_2 是标准溶液中的 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 的质量, μg ; M_2 是标准溶液中的 CNCbl 的质量, μg ; M_s 是婴儿配方奶粉样品的质量, kg 。

1.4.4 校准曲线同位素稀释质谱法 (SCC-IDMS)

对于 SCC-IDMS 法,相应地制备了甲醇中的 CNCbl 标准溶液,其校准水平范围为 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。将同位素内标 ($^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$) 加入 5 组溶液中,其中 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 的浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。通过甲醇标准溶液中 CNCbl 和 $^{13}\text{C}_7\text{CNCbl}$ 质谱响应比与浓度比绘制校准曲线。根据式(6)~(7)可计算每个婴儿配方奶粉样品中 CNCbl 的质量浓度。

$$\frac{A_2}{A'_2} = K \times \frac{M \times M_s}{M'_2} + b \quad (6)$$

$$M = \frac{\left(\frac{A_2}{A'_2} - b\right) \times M'_2}{K \times M_s} \quad (7)$$

2 结果与讨论

测量不确定度包括按照统计学方法计算的 A 类不确定度分量和通过对测量影响因素的分析,以非统计分析的方法评定的 B 类不确定度分量。本文对四种定量方法不确定度进行了评估,相对标准不确定度各分量见表 1。

表 1 不同定量方法相关分量相对标准不确定度

Tab.1 Relative standard uncertainty values of each components of the quantitative methods

不确定度来源		SA	SA-IDMS	SP-IDMS	SCC-IDMS
A类不确定度	重复性 $u_{\text{ref,rep}}$	3.3%	1.1%	1.6%	1.3%
	标准物质纯度 $u_{\text{ref,p}}$	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%
B类不确定度	溶液制备与称量 $u_{\text{ref,w}}$	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%
	校准曲线 $u_{\text{rel,cal}}$	6.3%	2.5%	/	2.6%
	合成不确定度	7.2%	2.8%	1.7%	3.0%
扩展不确定度 $U(k=2)$		14.4%	5.6%	3.4%	6.0%

2.1 SA 方法不确定度

SA 方法的 A 类不确定度主要由测量重复性 $u_{\text{ref,rep1}}$ 引入; B 类不确定度包含校准曲线引入的不确定度 $u_{\text{rel,cal1}}$ 、标准物质纯度引入的不确定度 $u_{\text{ref,p1}}$ 和溶液制备与称量引入的不确定度 $u_{\text{ref,w1}}$ 。

采用贝塞尔公式计算测量值的相对标准偏差 s_x 如式(8),得到 A 类测量不确定度 $u_{\text{rel,rep1}}$ 如式(9)。

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (8)$$

$$u_{\text{rel,rep1}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}\bar{x}} = 3.3\% \quad (9)$$

使用 Linest 函数模型对实验结果最小二乘拟合,相对标准不确定度 $u_{\text{rel,cal1}}$ 如式(10)。

$$u_{rel,cal1} = \sqrt{\left(\frac{s_K}{K}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2} = 6.3\% \quad (10)$$

其中, K 为线性方程斜率; b 为线性方程截距; s_K 是 K 的标准偏差; s_b 是 b 的标准偏差。

维生素 B12 标准物质纯度相对标准不确定度 $u_{ref,p1}=0.4\%$ 。称量不确定度来源于维生素 B12 溶液的制备、样品称量、标准曲线样品中维生素 B12 添加量等。对天平的变动性、最大允差引入的不确定度评估, 根据母液、中间液、校准溶液制备、样品及维生素 B12 添加等称量, 计算各步骤引入的不确定度, 对各项不确定度进行合成得到相对标准不确定度 $u_{ref,w1}=0.1\%$ 。

将 A 类与 B 类不确定度合成得到 SA 方法相对标准不确定度 u_{SA} 如式(11)。

$$u_{SA} = \sqrt{u_{rel,rep1}^2 + u_{rel,p1}^2 + u_{rel,w1}^2 + u_{rel,cal1}^2} = 7.2\% \quad (11)$$

取 95% 的置信水平, 扩展不确定度 U_{SA} 如式(12)。

$$U_{SA} = ku_{SA} = 14.4\% (k = 2) \quad (12)$$

2.2 SA-IDMS 方法不确定度

SA-IDMS 方法的 A 类不确定度 $u_{ref,rep2}$ 主要由测量重复性引入; B 类不确定度包括校准曲线引入的不确定度 $u_{rel,cal2}$ 、标准物质纯度引入的不确定度 $u_{ref,p2}$ 和溶液制备与称量引入的不确定度 $u_{ref,w2}$ 。

根据式(8)~(10), 得到 $u_{ref,rep2}=1.1\%$, $u_{rel,cal2}=2.5\%$ 。又知 $u_{ref,p2}=0.4\%$; 称量不确定度来源于维生素 B12 及内标($^{13}C_7$ -CNCbl)溶液的制备、样品质量、标准曲线样品中维生素 B12 及内标添加量。天平称量不确定度评估方式同 SA 方法, 但此方法引入同位素内标, 称量不确定度中增加了内标溶液的制备与稀释引入不确定度。各步骤不确定度合成后, 计算称量引入的相对标准不确定度 $u_{ref,w2}=0.2\%$ 。

SA-IDMS 方法的相对标准不确定度如式(13)。

$$u_{SA-IDMS} = \sqrt{u_{rel,rep2}^2 + u_{rel,p2}^2 + u_{rel,w2}^2 + u_{rel,cal2}^2} = 2.8\% \quad (13)$$

根据式(12), 扩展不确定度 $U_{SA-IDMS}$ 为 5.6% ($k = 2$)。

2.3 SP-IDMS 方法不确定度

SP-IDMS 方法的 A 类不确定度主要是测量的不确定度 $u_{ref,rep3}$; B 类不确定度包括标准物质纯度引入的不确定度 $u_{ref,p3}$ 和溶液制备与称量引入的不确定度 $u_{ref,w3}$ 。

根据式(8)~(9), 得到 $u_{ref,rep3}=1.6\%$ 。又知

$u_{ref,p3}=0.4\%$; 称量不确定度来源于维生素 B12 及内标准溶液及中间液的制备、样品质量、单点校准溶液配制。称量引入的相对标准不确定度 $u_{ref,w3}=0.1\%$ 。

SP-IDMS 方法的相对标准不确定度计算如式(14)。

$$u_{SP-IDMS} = \sqrt{u_{rel,rep3}^2 + u_{rel,p3}^2 + u_{rel,w3}^2} = 1.7\% \quad (14)$$

经计算扩展不确定度 $U_{SP-IDMS}$ 为 3.4% ($k = 2$)。

2.4 SCC-IDMS 方法不确定度

SCC-IDMS 方法的 A 类不确定度主要是测量的不确定度 $u_{ref,rep4}$; B 类不确定度包括校准曲线引入的不确定度 $u_{rel,cal4}$ 、标准物质纯度引入的不确定度 $u_{ref,p4}$ 和溶液制备与称量引入的不确定度 $u_{ref,w4}$ 。

校准曲线引入的相对标准不确定度 $u_{rel,cal4}$ 计算如式(15)~(16)。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (Kx_i + b)]^2}{n - 2}} \quad (15)$$

$$u_{rel,cal4} = \frac{S}{cK} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 2.6\% \quad (16)$$

其中, S 为校准曲线残差; p 为样品溶液的测定次数; n 为曲线浓度点的总测定次数; y_i 为校准曲线纵坐标值; x_i 为校准曲线横坐标值; \bar{x} 为维生素 B12 及内标质量浓度比值的平均值; c 为由校准曲线得到的样品质量浓度比。

根据式(8)~(9), 得到 $u_{ref,rep4}=1.3\%$ 。又知 $u_{ref,p4}=0.4\%$; 称量不确定度来源于其维生素 B12 及内标准溶液及中间液的制备、样品质量、系列校准溶液曲线配制。称量引入的相对标准不确定度 $u_{ref,w4}=0.2\%$ 。

SCC-IDMS 方法合成的相对标准不确定度如式(17)。

$$u_{SCC-IDMS} = \sqrt{u_{rel,rep4}^2 + u_{rel,p4}^2 + u_{rel,w4}^2 + u_{rel,cal4}^2} = 3.0\% \quad (17)$$

经计算, 扩展不确定度 $U_{SCC-IDMS}$ 为 6.0% ($k = 2$)。

2.5 四种定量方法不确定度差异

对四种定量方法的不确定度分量的贡献进行分析, 结果见图 1。可以看出, SA 方法扩展不确定度 U_{SA} 为 14.4%, 不确定度中 $u_{rel,cal1}$ 所占比例最大为

62.3%，其次是 $u_{\text{ref,rep1}}$ 所占比例为 32.6%，而 $u_{\text{ref,p1}}$ 和 $u_{\text{ref,w1}}$ 分别为 3.9% 和 1.2%；SA-IDMS 方法扩展不确定度 $U_{\text{SA-IDMS}}$ 为 5.6%，不确定度中 $u_{\text{rel,cal2}}$ 所占比例最大为 60.7%，其次是 $u_{\text{ref,rep2}}$ 所占比例为 26.1%， $u_{\text{ref,p2}}$ 和 $u_{\text{ref,w2}}$ 分别为 9.8% 和 3.4%。两种方法的不确定度中曲线及方法重复性引入的不确定度占比较大。SA 方法中根据截距和校准曲线的斜率计算婴儿配方奶粉中 CNCbl 的浓度；SA-IDMS 方法中根据分析物与内标物的峰面积比以及质量比获得校准曲线。在 IDMS 方法中使用同位素标记时，可以避免基质效应和前处理差异引入的误差，方法精密度更好。因此，同位素内标法(SA-IDMS)重复性及曲线引入的不确定度小于不采用同位素内标的 SA 方法。SP-IDMS 方法扩展不确定度 $U_{\text{SP-IDMS}}$ 为 3.4%，不确定度 $u_{\text{ref,rep3}}$ 所占比例最大为 74.7%， $u_{\text{ref,p3}}$ 为 18.8%， $u_{\text{ref,w3}}$ 为 6.5%。SCC-IDMS 方法扩展不确定度 $U_{\text{SCC-IDMS}}$ 为 6.0%，不确定度 $u_{\text{rel,cal4}}$ 所占比例最大为 58.2%， $u_{\text{ref,rep4}}$ 、 $u_{\text{ref,p4}}$ 和 $u_{\text{ref,w4}}$ 所占比例分别为 28.7%、9.0% 和 4.0%。

结果表明，IDMS 相关方法具有较高的精密度，重复性测量引入的不确定度和校准曲线引入的不确定度均小于不采用内标的 SA 方法。孔祥明等^[17]研究不同定量方法对蔬菜农药残留测量不确定度的影响时，发现单点内标标准曲线法和外标标准曲线法引入的相对标准不确定度基本相同且大于单点外标法，其中曲线拟合不确定度贡献较大，应加以控制。Kim 等^[3]也表明校准曲线和标准溶液是导致不确定度的主要因素。

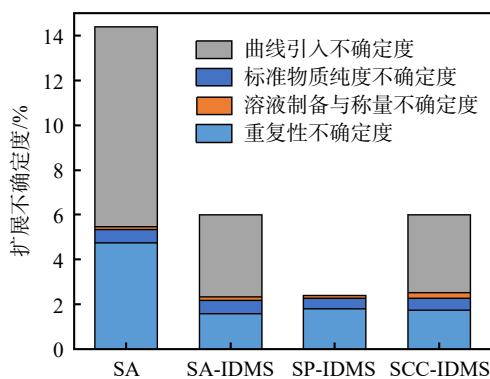


图 1 不同定量方法不确定度及分量的比例

Fig.1 Uncertainty values of different quantitative methods with contribution from associate components

3 结论

本文对婴儿配方乳粉中维生素 B12 检测的 4

种定量方法进行了不确定度评估，结果显示 SA 方法相对标准不确定度最大，量值是 SA-IDMS、SP-IDMS、SCC-IDMS 的不确定度的两倍以上。SA 方法中校准曲线引入的不确定度和方法重复性引入的不确定度为主要的 uncertainty 来源。与 SA 方法相比，IDMS 相关方法具有较高的精密度，与重复性相关的不确定度更小。对复杂基体中痕量化合物测量时，可通过选择同位素内标法提高测量结果的精密度。

参考文献

- [1] 国家市场监督管理总局. 测量不确定度评定与表示: JJF1059.1-2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2013.
- [2] DJELLOULI O, ROZET E, DAHMANI B, *et al.* Compromise in uncertainty estimation by modelling and validation approaches for an HPLC-UV method for measurement of biochemical indicators of vitamins A and E[J]. *Analyst*, 2018, 143(6): 1492-1501.
- [3] KIM J M, CHOI S H, SHIN G H, *et al.* Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils commonly consumed in Korea[J]. *Food Chem*, 2016, 213: 19-25.
- [4] LI Y, GILL B D, GRAINGER M N C, *et al.* The analysis of vitamin B12 in milk and infant formula: A review[J]. *Int Dairy J*, 2019, 99: 104543.
- [5] LI X Q, YANG Z, ZHANG Q H, *et al.* Evaluation of matrix effect in isotope dilution mass spectrometry based on quantitative analysis of chloramphenicol residues in milk powder[J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 807: 75-83.
- [6] RAPOSO F, BARCELÓ D. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory view points[J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2021, 134: 116068.
- [7] BIENVENU JF, PROVENCHER G, BELANGER P, *et al.* Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(14): 7560-7568.
- [8] MARTINS ML, RIZZETTI TM, KEMMERICH M, *et al.* Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1460: 84-91.
- [9] PÉREZ-FERNÁNDEZ V, GENTILI A, MARTINELLI A, *et al.* Evaluation of oxidized buckypaper as material for the solid phase extraction of cobalamins from milk: Its efficacy as individual and support sorbent of a hydrophilic-lipophilic balance copolymer[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1428: 255-266.
- [10] ZIRONI E, GAZZOTTI T, BARBAROSSA A, *et al.* Technical note: development and validation of a method using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of vitamin B12 concentrations in milk and dairy products[J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(5): 2832-2836.