高效液相色谱法测定茶饮料中苯甲酸结果不确定度评定

蔡 秋，朱 明
(贵州出入境检验检疫局综合技术中心，贵州 贵阳 550004)

摘 要：本文采用分层建模方法建立了高效液相色谱法测定茶饮料中苯甲酸结果不确定度评定的数学模型，对测量过程中的不确定度来源进行逐层分析和合成，运用最小二乘法对外标曲线拟合的不确定度进行了评定，采用极差法评定测量次数较少时引起的测量不确定度。本方法对采用外标法定量的高效液相色谱、气相色谱等测定结果的不确定度评定具有参考作用。

关键词：高效液相色谱；不确定度；苯甲酸

Uncertainty Evaluation for Determining Concentration of Benzioc Acid in Tea Drink by HPLC

CAI Qiu, ZHU Ming
(Technic Center, Guizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guiyang 550004, China)

Abstract: This paper establishes mathematical model of uncertainty evaluation for determining the concentration of benzioc acid in tea drink by high performance liquid chromatography, adopting the method of layer modeling evaluation. The sources of uncertainty are analyzed to compose steps for whole determination procedure. The uncertainty of external calibration curve fitting is evaluated with the least square method. Uncertainty resulted from the less measurement times is evaluated by using the extreme deviation method. The evaluating method of uncertainty could be used as references for evaluating the uncertainty of determined results in high performance liquid chromatography and gas chromatography with external calibration curve.

Key words: HPLC; uncertainty; benzioc
中图分类号：0212.1；0657.72 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2007)02-0277-04

防腐剂是能抑制微生物生长，防止食品腐败变质，延长保存期的一类食品添加剂。目前使用的食品防腐剂主要是化学合成的物质，它们对微生物的细胞质有破坏作用，对人体细胞同样有一定的损害作用，世界许多国家对食品中防腐剂的含量都有限量要求。苯甲酸是使用非常广泛的酸性食品防腐剂，高效液相色谱法已广泛用于其定量检测，为了符合中国实验室国家认可委员会(CNAL)认可规则CNAL/AR11：2002测量不确定度政策[1]和为了在测量数据的处理、测量结果的表达和测量结果质量评定等方面与国际接轨，我们根据JJF1059－1999《测量不确定度评定与表示》[2]，对高效液相色谱法测定茶饮料中苯甲酸测量结果不确定度进行了测量和评定，为评定测量结果质量提供了科学依据。本文介绍了该评定方法和评定结果。

1 概 述

测量方法 GB/T 5009.29—2003 高效液相色谱法[3]；测量仪器 日本岛津公司LC-10A高效液相色谱仪；环境条件 温度20±5℃，相对湿度≤75%；测量过程 称取试样1.00g，调pH7，加水定容至10ml，经0.45μm滤膜过滤，上机测量，用外标曲线法定量。

2 数学模型

测量结果计算公式

$$X=\frac{C\times V\times 1000}{m\times 1000} \quad (1)$$

式中，X为试样中苯甲酸的含量(g/kg)；C为由标准曲线得出的试样中苯甲酸的浓度(mg/L)；V为试样定容总体积(ml)；m为试样的质量(g)。

样品测定结果的不确定度除结果计算公式中的C、V和m因子的影响外，样品的均匀性和处理过程的一致性都对测定结果产生影响，考虑其影响量，公式中需加入其修正因子f_{rep}，式(1)则转化为下列数学模型：

收稿日期：2005-12-21
作者简介：蔡秋(1963-)，女，高级工程师，主要从事进出口食品、化妆品理化检测研究。

万方数据

$$X = \frac{C \times V}{m} \times f_{rep} \quad (2)$$

从数学模型中可看出，各影响参数相互独立，且各参数的不确定度直接对被测量X的不确定度产生影响，即灵敏系数等于1，合成标准不确定度可用相对标准不确定度进行合成，根据JJF1059－1999中6.7，合成标准不确定度u_{Crel}表示为：

$$u_{Crel}^2(y) = \sum_{i=1}^{N} u^2(x_i) \quad (3)$$

由公式(2)和公式(3)可推导出测试样品的相对合成标准不确定度计算公式

$$u_{Crel}(X) = \sqrt{u_{rel}^2(C) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(f_{rep})} \quad (4)$$

3 不确定度来源

从测量过程和数学模型分析，苯甲酸含量测定的不确定度主要来源于标准物质，标准曲线的拟合，样品峰面积的测量，仪器的响应值和测量和样品处理操作过程的差异，每一种来源又分别受不同因素的影响，其不确定度来源可归纳为以下几方面。

3.1 试样处理液中苯甲酸含量测定值C的不确定度

3.1.1 标准溶液的浓度—峰面积拟合校准曲线求得C时产生的不确定度

3.1.2 配制标准工作溶液产生的不确定度

主要包括：a.标准物质引入的不确定度；b.称量产生的不确定度；c.标准工作液配制过程量器校准产生的不确定度；d.标准工作液配制过程温度变化产生的不确定度。

3.1.3 试样处理液峰面积测量的不确定度

主要包括：a.峰面积重复测量产生的不确定度；b.仪器数据处理系统引入的不确定度。

3.2 样品称量m的标准不确定度

3.3 样品处理后的总体积V的标准不确定度

主要包括：a.容量瓶校准的不确定度； b.温度变化产生的不确定度。

3.4 试样均匀性和处理操作过程f_{rep}产生的不确定度

4 标准不确定度分量的评定

根据标准不确定度来源分别进行不确定度的评定。

4.1 试样处理液中苯甲酸含量测定值C的不确定度

4.1.1 校准曲线拟合的标准不确定度

校准曲线拟合的标准不确定度是通过对空白和标准系列进行2次重复测定，空白溶液调零，测得其峰面积，它包含了峰面积重复测量产生的不确定度，仪器数据处理系统引入的不确定度和标准溶液进样量的不确定度和曲线拟合相关性的不确定度。测定结果见表1。

表1 校准曲线拟合数据

Table 1 Data of fitting calibration curve

浓度X_i(mg/L)		0.5	1.0	1.5	2.0
峰面积	1	38231	77628	115853	156608
	2	37155	76688	114977	159937
	$\bar{Y}$	37693	77158	115415	158272

样品测量的估计值是由实验数据用最小二乘法拟合的直线得到，其拟合校准曲线参数的标准不确定度可以利用统计程序计算获得，根据测量数据用线性回归方程y＝a + bx求出校准曲线，由最小二乘法得到拟合直线的斜率b和截距a分别为：

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})} = 79999.1$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = 97134.6 - 79999.1 \times 1.25 = -2864.3$$

峰面积测量的标准偏差S为：

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} V_i}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}[y_i - (a + bx_i)]^2}{n-2}} = 872.18$$

应用该曲线进行测量时，对被测样品处理溶液测量2次，即p＝2，测得处理液中苯甲酸的最佳估计值为0.617mg/L，于是校准曲线拟合的标准不确定度u(ure)为：

$$u(ure) = \frac{s}{b}\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})}{S_{xx}}} = 0.00639$$

相对标准不确定度u_{rel}(ure)＝u(ure)/C＝0.00639/6.17＝0.00104

4.1.2 制备标准工作溶液产生的不确定度评定

4.1.2.1 标准物质引入的不确定度评定

根据标准物质证书提供的信息，苯甲酸的不确定度是1％。一般认为，标准物质给出的是扩展不确定度，属正态分布，置信水平为99％，包含因子k＝3，为B类评定，其相对不确定度为：

$$u_{1rel} = \frac{U}{k} = \frac{1\%}{3} = 3.33 \times 10^{-3}$$

4.1.2.2 称量产生的不确定度评定

标准物质的称样量为：0.100g，天平检定证书给出的质量允许差Δy=1.0mg，其置信水平p＝99%，属正态分布，包含因子k ＝3。

标准不确定度为：$u_2 = \frac{\Delta y}{k} = \frac{1.0mg}{3} = 3.33 \times 10^{-4} g$

相对标准不确定度：$u_{2rel} = \frac{u_2}{m} = \frac{3.33 \times 10^{-4}}{0.1} = 3.33 \times 10^{-3}$

万方数据

4.1.2.3 标准工作液配制过程量器校准产生的不确定度评定

标准工作液制备过程使用了一系列玻璃量具，按照《常用玻璃量具检定规程 JJG196－1990》[4]的要求，均有相应的最大允差，按照矩形分布考虑，k= $\sqrt{3}$ ，由此估算相对不确定度分量(见表2)。

表2 标准系列配制过程中量具校准引起的不确定度

Table 2 Uncertainty arouse from errors in calibration of volumetric flask and pipets used in preparation of standard series

玻璃量具	最大允差(ml)	标准不确定度	相对标准不确定度
100 ml单标线容量瓶A级	±0.10	0.0577	$u_1=5.77\times10^{-4}$
1ml分度吸管A级	±0.008	0.00462	$u_2=4.62\times10^{-3}$
100 ml单标线容量瓶A级	±0.10	0.0577	$u_3=5.77\times10^{-4}$
2ml分度吸管A级	±0.012	0.0069	$u_4=3.45\times10^{-3}$
10ml单标线容量瓶A级	±0.02	0.0346	$u_5=3.46\times10^{-3}$

由表2数据合成的相对标准不确定度：

$$u_{3rel}=\sqrt{u_1^2+u_2^2+u_3^2+u_4^2+u_5^2}=6.77\times10^{-3}$$

4.1.2.4 标准工作液配制过程温度变化产生的不确定度评定

由于温度缺乏控制而产生不确定度。根据制造商提供的信息，该量具已在于20 ℃校准，而实验室的温度在±5 ℃之间变动，该影响引起的不确定度可通过估算温度范围和体积膨胀系数来进行计算，液体的体积膨胀明显大于玻璃的体积膨胀，因此，只需考虑前者即可。水的膨胀系数为2.1×10^{-4}℃$^{-1}$，计算标准不确定度时假设温度变化是矩形分布。

由表3数据合成的相对标准不确定度：

$$u_{4rel}=\sqrt{u_1^2+u_2^2+u_3^2+u_4^2+u_5^2}=1.36\times10^{-3}$$

4.1.2.5 制备标准溶液产生的不确定度的合成

由标准物质、称量、量具校准和温度变化的标准不确定度分量合成标准溶液的相对标准不确定度：

$$u_{Crel}(std)=\sqrt{u_{1rel}^2+u_{2rel}^2+u_{3rel}^2+u_{4rel}^2}$$

$$=\sqrt{0.00333^2+0.00333^2+0.00677^2+0.00136^2}=8.36\times10^{-3}$$

4.1.3 试样处理液峰面积测量的不确定度评定

4.1.3.1 峰面积重复测量产生的不确定度

通过重复进样进行评定，它包含试样进样量的不确定度，该不确定度属A类评定，由表4数据计算。

表4 重复进样测量结果

Table 4 Data of repeat determination in sample

进样次数	1	2	3	4	5	6	平均值	极差R
峰面积Ax	42495	44005	44086	43127	41156	41179	42674	2930

由于测量次数较少，根据JJF1059-1999 4.4，采用极差法进行评定。

标准不确定度：$u_{A_x}=S(A_x)=\frac{R}{C}=\frac{2930}{2.53}=1158.10$

相对标准不确定度：$u_{1rel}=\frac{u_{A_x}}{\overline{A_x}}=\frac{1158.10}{42674}=0.02714$

4.1.3.2 仪器数据处理系统引入的不确定度

根据仪器说明书和积分仪的一般性能指标分析，目前用于液相色谱仪峰面积积分处理的最大误差为0.2%～1%，取1%，属B类评定，则该峰面积的相对不确定度为：$u_{2rel}=\frac{U}{k}=\frac{1\%}{\sqrt{3}}=5.77\times10^{-3}$

4.1.3.3 试样处理液峰面积测量的不确定度的合成

由u_{1rel}和u_{2rel}合成苯甲酸试样处理液峰面积测量的相对标准不确定度为：

$$u_{Crel}(A_x)=\sqrt{u_{1rel}^2+u_{2rel}^2}=\sqrt{0.02714^2+0.00577^2}=0.02775$$

由4.1.1、4.1.2和4.1.3的不确定度分量合成样品处理液苯甲酸含量测定值C的相对标准不确定度：

$$u_{Crel}(C)=\sqrt{u_{rel}^2(ure)+u_{Crel}^2(std)+u_{Crel}^2(A_x)}=0.02843$$

4.2 样品称量m的标准不确定度

样品称样量为：1.00g，按JJG2053－1999《质量计量器具检定系统》所给出的质量允许差Δy=1.0mg，其置信水平p=99%，属正态分布，包含因子k=3。

不确定度为：$u_2=\frac{\Delta y}{k}=\frac{1.0mg}{3}=3.33\times10^{-4}g$

相对标准不确定度：$u_{2rel}=\frac{u_2}{m}=\frac{3.33\times10^{-4}}{1.00}=3.33\times10^{-4}$

4.3 样品处理后的总体积V的标准不确定度

4.3.1 容量瓶校准的不确定度

样品处理后用10ml的B级容量瓶定容，根据JJG196-90《常用玻璃量具检定规程》，其最大允许误差±0.020ml，按矩形分布考虑。

$u_1=\Delta y/k=0.020ml/\sqrt{3}=0.01155$

表3 温度变化引起的标准系列配制过程中的不确定度

Table 3 Uncertainty arouse from effect of change in temperature on the volumetric glass wares during preparation of standard series

玻璃量具	计算公式	标准不确定度	相对标准不确定度
100ml单标线容量瓶	$100\times5\times2.1\times10^{-4}/\sqrt{}$	0.0606	$u_1=6.1\times10^{-4}$
1 ml分度吸管	$1\times5\times2.1\times10^{-4}/\sqrt{}$	0.000606	$u_2=6.1\times10^{-4}$
100 ml单标线容量瓶	$100\times5\times2.1\times10^{-4}/\sqrt{}$	0.0303	$u_3=6.1\times10^{-4}$
2ml分度吸管	$2\times5\times2.1\times10^{-4}/\sqrt{}$	0.0012	$u_6=6.1\times10^{-4}$
10ml单标线容量瓶	$0\times5\times2.1\times10^{-4}/\sqrt{}$	0.0152	$u_7=6.1\times10^{-4}$

万方数据

表6 相对标准不确定度一览表

Table 6 Collection of standard uncertainty

分量名称	不确定度来源		类型	相对标准不确定度	
$u_{rel}(C)$	校准曲线的拟合		A	1.04×10^{-3}	0.02843
	标准溶液配制的不确定度	标准物质的不确定度	B	3.33×10^{-3}	
		称量的不确定度	B	3.33×10^{-3}	
		标准配制量器校准的不确定度	B	6.77×10^{-3}	
		标准配制温度变化的不确定度	B	1.36×10^{-3}	
	试样处理液峰面积	峰面积测量的不确定度	A	0.02714	
$u_{rel}(m)$	测量的不确定度	仪器数据处理系统的不确定度	B	5.77×10^{-3}	1.18×10^{-3}
	样品称量m的标准不确定度		B	3.33×10^{-4}	
$u_{Crel}(V)$	样品处理后定容体积	容量瓶校准的不确定度	B	1.16×10^{-3}	
$u_{Crel}(frep)$	的标准不确定度	温度变化产生的不确定度	B	2.42×10^{-4}	
	试样处理操作过程的不确定度		A	8.16×10^{-3}	

相对不确定度 $u_{1rel}=0.01155/10=1.16\times10^{-3}$

4.3.2 温度变化产生的不确定度

在分析测试中测量的温度 $T_t=23℃$，量瓶的校准温度 $T_0=20℃$，水的膨胀系数为 $2.1\times10^{-4}/℃$，温度变化是矩形分布，标准不确定度

$$u_2=\frac{V\times\Delta T\times2.1\times10^{-4}}{\sqrt{3}}=\frac{10\times2\times2.1\times10^{-4}}{\sqrt{3}}=2.42\times10^{-3}$$

相对标准不确定度 $u_{2rel}=2.42\times10^{-3}/10=2.42\times10^{-4}$

4.3.3 样品处理后的总体积V的标准不确定度合成

$$u_{rel}(V)=\sqrt{u_{1rel}^2+u_{2rel}^2}=\sqrt{0.00116^2+0.00242^2}=1.18\times10^{-3}$$

4.4 试样均匀性和处理操作过程(f_{rep})产生的不确定度的评定

检测结果的重现性主要受操作人员的样品处理过程的一致性，样品的均匀性和仪器本身的性能因素影响，该不确定度属A类评定，采用同一样品进行重复实验进行评估。其重复实验结果见表5。

表5 重复实验结果

Table 5 Results data of repeat experimentation in sample

重复号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值
测定结果 X_i(mg/kg)	4.14	6.34	6.30	6.17	6.34	6.10	6.04	5.96	6.17

单次测量结果的标准偏差：$S_x=\sqrt{\frac{\sum(X_i-\overline{X})^2}{n-1}}=0.1421$

标准不确定度：$u_2=\frac{S_x}{\sqrt{n}}=\frac{0.1421}{\sqrt{8}}=0.05024$

相对不确定度为：$u_{2rel}=\frac{u_2}{\overline{X}}=\frac{0.05024}{6.17}=0.00816$

5 标准不确定度各分量汇总

6 合成标准不确定度评定

由表6中各相对不确定度合成：

$$u_{Crel}(X)=\sqrt{u_{Crel}^2(C)+u_{rel}^2(m)+u_{Crel}^2(V)+u_{Crel}^2(frep)}$$

$$=\sqrt{0.02843^2+(3.33\times10^{-4})^2+(1.18\times10^{-3})^2+(8.16\times10^{-3})^2}=0.029$$

7 扩展不确定度评定

扩展不确定度可由合成标准不确定度乘以包含因子，取置信概率p=95%，则k=2，因此，茶饮料中苯甲酸含量测定的相对扩展不确定度为：

$$U=u_{Crel}(X)\cdot k=0.029\times2=0.058$$

由实验数据的平均值计算得试样中苯甲酸含量的最佳估计值 $C_x=6.17mg/kg$，故其扩展不确定度为：$U=6.17mg/kg\times0.058=0.36mg/kg$。

8 测量不确定度报告

茶饮料中苯甲酸测量结果为：

$C_x=(6.17\pm0.36)\ mg/kg$ $k=2$。

参考文献：

[1] 中国实验室国家认可委员会. 实验室认可与管理基础知识[M]. 北京: 中国计量出版社, 2003: 176.

[2] JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社, 2000.

[3] GB/T 5009.29-2003 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[4] JJG196—1990 常用玻璃量具检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2000: 4-6.

万方数据

高效液相色谱法测定茶饮料中苯甲酸结果不确定度评定

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

作者： 蔡秋， 朱明， CAI Qiu， ZHU Ming
作者单位： 贵州出入境检验检疫局综合技术中心,贵州,贵阳,550004
刊名： 食品科学 ISTIC PKU
英文刊名： FOOD SCIENCE
年，卷(期)： 2007,28(2)
被引用次数： 7次

参考文献(4条)

1. JJG 196-1990.常用玻璃量具检定规程[期刊论文]-北京:中国计量出版社 2000

2. GB/T 5009.29-2003.食品中山梨酸、苯甲酸的测定 2004

3. JJF 1059-1999.测量不确定度评定与表示 2000

4. 中国实验室国家认可委员会 实验室认可与管理基础知识 2003

引证文献(7条)

1. 杜淑霞 高效液相色谱法测定含乳饮料中安赛蜜含量的不确定度评定[期刊论文]-食品研究与开发 2010(2)

2. 赵勤.叶红齐.钱学仁.蒯勤.李进中 水滑石及其焙烧产物对水中苯甲酸根的吸附研究[期刊论文]-应用化工 2010(7)

3. 王志玲.赵忠.朱海兰 异烟酸-巴比妥酸分光光度法测定苦杏仁油氰化物含量的不确定度评定[期刊论文]-西北农业学报 2010(10)

4. 王新华.卢忠魁.尚轶 液相色谱法测定饮料中山梨酸不确定度评估[期刊论文]-北华大学学报（自然科学版） 2009(5)

5. 刘燕.陈利国.彭新凯.胡朝晖.曹小彦 气相色谱法测定果冻中环己基氨基磺酸钠(甜蜜素)结果不确定度评定[期刊论文]-食品与机械 2008(2)

6. 杨小宁.郭靓.但德忠 环境监测中仪器分析方法不确定度的评估(III)——色谱分析中的测量不确定度[期刊论文]-四川环境 2007(6)

7. 甘合智 气相色谱法测定腐乳中脱氢乙酸的测量不确定度评定[期刊论文]-化学分析计量 2007(5)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702072.aspx