

高效液相色谱法测定婴幼儿营养米粉中维生素 A、D₃ 和 E 含量的不确定度评定

Evaluation of uncertainty in the determination of V_A, V_{D₃} and V_E in nutritional rice flour for infants and young children by HPLC

张荣彬¹ 戴志勇² 李梦怡² 陈振桂² 任国谱¹

ZHANG Rong-bin¹ DAI Zhi-yong² LI Meng-yi² CHEN Zhen-gui² REN Guo-pu¹

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 2. 英氏控股集团股份有限公司, 湖南 长沙 410005)

(1. Food Institute of Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Engnice Holding Group Co., Ltd., Changsha, Hunan 410005, China)

摘要:依据 JF1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》, 建立高效液相色谱法同时测定婴幼儿营养米粉中维生素 A、D₃ 和 E 含量不确定度的数学模型, 对测量过程中的各不确定度来源进行逐层分析、量化和合成。当取样量为 5.000 g 时, 样品中维生素 A、D₃ 和 E 扩展不确定度为 0.188 4, 0.009 3, 0.006 7 μg/g, 测定含量为 (9.250 0 ± 0.188 4), (0.114 0 ± 0.009 3), (0.181 5 ± 0.006 7) μg/g。最终结果的不确定度主要是由标准溶液储备液配制、标准工作曲线拟合和回收率引起。

关键词:高效液相色谱; 婴幼儿营养米粉; 维生素 A; 维生素 D₃; 维生素 E; 不确定度评定

Abstract: The uncertainty of the determination of V_A, V_{D₃} and V_E content in infant nutritional rice flour by HPLC was evaluated. According to JF1059.1—2012 "evaluation and Representation of Measurement Uncertainty", a mathematical model for simultaneous determination of V_A, V_{D₃} and V_E content uncertainty in infant nutrition rice flour by HPLC was established, and the sources of uncertainty in the measurement process were analyzed, quantified and synthesized layer by layer. When the sampling volume was 5.000 g, the expanded uncertainty of V_A, V_{D₃} and V_E in the sample was 0.188 4, 0.009 3, 0.006 7 μg/g, and the measured content was (9.250 0 ± 0.188 4), (0.114 0 ± 0.009 3), (0.181 5 ± 0.006 7) μg/g, respectively. The uncertainty of the final result was mainly caused by the preparation of standard solution reserve, fitting of standard working curve and recovery rate.

Keywords: high performance liquid chromatography; infant nutrition rice flour; V_A; V_{D₃}; V_E; uncertainty rating

维生素 A 和 D 是国家标准规定婴幼儿营养米粉中必须添加的维生素, 维生素 E 是可选择添加的维生素。维生素 A、D 和 E 分别履行不同的职能, 适当的添加维生素有助于婴幼儿的生长发育^[1]。维生素 A 对多种眼科疾病治疗具有积极的作用, 可促进眼内色素形成, 防止夜盲和视力恶化^[2], 对机体的生理具有调节功能, 促进身体成长发育、保持代谢平衡和增强免疫力^[3]。维生素 D 对部分矿物质元素吸收具有促进作用, 并保持体内钙、磷含量足够。同时, 在内分泌系统中, 维生素 D 还参与机体调节和无机盐交换^[4]。维生素 E 俗称生物酚, 对生殖器官的正常功能具有维持作用^[5], 可降低衰老速度, 增强机体耐力, 保护细胞组织和预防疾病。而过量摄入维生素 A、D 和 E 也会产生副作用, 因此监测和控制维生素含量十分重要。

测量不确定度是表征合理的赋予被测量之值的分散性, 是与测量结果相联系的参数^[6], 不确定度评估在实验室数据比对、方法确认、标准设备校准和数值溯源等方面具有很重要的意义, 并且国际上与合格评定相关各方对测量不确定度也十分重视^[7-8]。在脂溶性维生素检测方法中, 最常用的为光谱法^[9]、色谱法^[10-11]、化学法和微生物法等, 但其存在种种缺点, 样品处理复杂、检测时间长、效率低, 且不能同时检测和分析多种维生素, 随着检测方法的不断发展, 高效液相色谱法, 提高了分析速度与灵敏度, 且可以同时进行多种维生素检测。参照 GB 5009.82—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》、JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和 JJG

作者简介:张荣彬, 男, 中南林业科技大学在读硕士研究生。

通信作者:任国谱 (1964—), 男, 中南林业科技大学教授, 博士。

E-mail: gprenhhzz@163.com

收稿日期:2020-10-21

196—2006《常用玻璃量器检定规程》标准,对高效液相色谱法测定幼儿营养米粉中维生素 A、D₃ 和 E 含量不确定度进行分析和评定,旨在提高试验结果的准确性,并为婴幼儿营养米粉的产品质量控制及检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

婴幼儿营养米粉:湖南英氏营养品股份有限公司检验研发中心质控样品。

1.2 试剂

抗坏血酸、BHT、无水乙醇、石油醚、甲醇、正己烷、无水硫酸钠、氢氧化钾:分析纯,广西西陇科学股份有限公司;

维生素 A、D₃ 和 E 标准品:浓度>98%,上海安普实验科技有限公司。

1.3 仪器与设备

超高效液相色谱仪(含二极管阵列检测器和自动进样器):LC-20AT 型,日本岛津公司;

避光恒温水域振荡器:SHA-B 型,常州博纳瑞仪器制造有限公司;

旋转蒸发器:RE-52AA 型,巩义市予华仪器有限责任公司。

1.4 方法

1.4.1 样品制备 称取 5.000 g 样品于 150 mL 锥形瓶,加入 30 mL 温水和 1 g 淀粉酶,60 °C 恒温水浴振荡 30 min 后加 1.0 g 抗坏血酸、0.1 g BHT、30 mL 无水乙醇、15 mL 氢氧化钾溶液,80 °C 回流皂化 30 min 后冷至室温,皂化液转入 250 mL 分液漏斗后加 50 mL 石油醚萃取 5 min,将水相转移至另一 250 mL 分液漏斗,按上述步骤萃取第 2 次后合并醚层,水洗至中性。醚层经无水硫酸钠滤入 250 mL 蒸发瓶,15 mL 石油醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次后一同并入,在旋转蒸发器水浴中减压蒸馏至近干后再氮吹至干,用甲醇定容至 10 mL 容量瓶,0.22 μm 有机系滤膜过滤检测维生素 A、E。

取 5 mL 上述溶液于 10 mL 容量瓶中水浴氮吹至干后加 1 mL 正己烷,0.22 μm 有机系滤膜过滤后进行半制

备,净化待测液。将待测液注入液相色谱仪,根据维生素 D₃ 标准溶液保留时间收集维生素 D₃ 馏分于 2 mL 容量瓶,水浴氮气吹干后加 1.0 mL 甲醇溶解,即维生素 D₃ 待测液。

1.4.2 维生素 A、D₃、E 标准液配制

(1) 维生素 A、D₃ 和 E 标准储备液配制:准确称取 25.0,2.4,65.9 mg 的维生素 A、D₃ 和 E(α-生育酚)标准品,无水乙醇溶解;维生素 A 和 E 用 50 mL 级容量瓶定容,质量浓度为 0.500,0.024 mg/mL;维生素 D₃ 用 100 mL 容量瓶定容,质量浓度为 1.318 mg/mL。

(2) 维生素 A、D₃ 中间液:分别吸取维生素 A 和 D₃ 标准储备液 2 mL 与 1 mL,分别在 10 mL 和 100 mL 容量瓶中用水定容,中间液质量浓度为 100 μg/mL 和 0.24 μg/mL。

(3) 维生素 A、D₃、E 标准曲线工作液:吸取维生素 A 中间液和维生素 E 标准储备液 100,200,400,600,800 μL,取 10 mL 容量瓶加水定容,维生素 A 工作液质量浓度 1,2,4,6,8 μg/mL,维生素 E 质量浓度 13.18,26.36,52.72,79.08,105.44 μg/mL。

吸取维生素 D₃ 中间液 100,200,400,600,800 μL,取 10 mL 容量瓶加水定容,得到质量浓度为 0.024,0.048,0.096,0.144,0.192 μg/mL 标准曲线工作液。

1.4.3 色谱条件 高效液相色谱法测定婴幼儿营养米粉中维生素 A、D₃ 和 E 的色谱条件见表 1。

2 模型建立

2.1 数学模型

要计算不确定性,必须首先完善用于计算测量值的数学模型,以便分析其可能的不确定性来源^[12]。只有考虑到影响测量值不确定度的主要因素时,整个计算过程中才能接受所得到的各自的相对不确定度值^[13],因此此次试验的维生素 A、D₃ 和 E 模型分别为:

$$X_{\text{维生素A}} = \frac{C \times V \times 100}{m \times R}, \quad (1)$$

$$X_{\text{维生素D}_3} = \frac{C \times 2 \times 100}{m \times f \times R}, \quad (2)$$

$$X_{\text{维生素E}} = \frac{C \times V \times 100}{m \times 1\,000 \times R}, \quad (3)$$

表 1 色谱条件

Table 1 Chromatographic conditions

物质	波长模式	色谱柱	柱温/°C	流动相	流速/ (mL · min ⁻¹)	进样量/ μL	进样体积/ μL	紫外检测 波长/nm
维生素 A	双波长	C ₃₀ (250 mm × 4.6 mm × 3 μm)	35 ± 1	V _{甲醇} : V _水 = 19 : 1	1.0	20	\	325
维生素 E								294
维生素 D 半制备	单波长	硅胶 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm)	35 ± 1	V _{环己烷} : V _{正己烷} = 1 : 1, 加 0.8% 异丙醇	1.0	\	500	264
维生素 D ₃	单波长	C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm × 5 μm)	35 ± 1	V _{甲醇} : V _水 = 19 : 1	1.0	20	\	264

式中:

X ——维生素的含量, $\mu\text{g}/100\text{ g}$;

C ——标准工作曲线计算得到的维生素浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

f ——维生素 D₃ 浓缩液体积, mL ;

V ——试样定容体积, mL ;

m ——试样质量, g ;

R ——回收率因子。

2.2 不确定度主要来源

参照试验方法并结合试验操作, 不确定的来源主要有: ① 样品制备过程引入的不确定度 U_{relYP} ; ② 标准物质引入的不确定度 U_{relBZ} ; ③ 重复性试验的不确定度 U_{relCF} ; ④ 回收率引入的相对标准不确定度 U_{relHS} 。

3 不确定度分量的评定

3.1 样品制备过程引入的不确定度 U_{relYP}

3.1.1 样品取样引入的不确定度 U_{relm1} 依据 GB/T 5009.1—2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》, 样品混匀后随机取样, 均匀且具有代表性, 忽略其不确定度。

3.1.2 样品称量引入的不确定度 U_{relm2} 根据电子天平检定证书, 最大允差为 $\pm 0.000\ 1\text{ g}$, 矩形分布, $K=\sqrt{3}$, 则其标准不确定度为:

$$U_s = \frac{0.000\ 1}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-5}\text{ g}。$$

取样量为 5.000 g 时引入的相对不确定度为:

$$U_{\text{relm2}} = \frac{U_s}{5.000\ 0} = 1.154 \times 10^{-5}。$$

3.1.3 样品定容引入的不确定度 U_{relD} 试样经过处理进行定容, 维生素 A 与 E 样品定容均采用 10 mL 容量瓶, 维生素 D₃ 样品在 10 mL 容量瓶初步处理后进行半制备, 半制备过程中使用 1 mL 和 5 mL 移液管, 并最终定容在 2 mL 容量瓶中, 结果见表 2。

根据表 2, 样品定容引入的不确定度为:

$$U_{\text{relD-维生素A}} = U_{\text{relD-维生素E}} = 0.001\ 31。$$

$$\begin{aligned} U_{\text{relD-维生素D}_3} &= \\ \sqrt{0.004\ 08^2 + 0.001\ 83^2 + 0.004\ 37^2 + 0.001\ 31^2} &= \\ 0.006\ 39。 \end{aligned}$$

3.1.4 样品制备引入的相对标准不确定度 样品制备引入的相对标准不确定度公式为:

$$U_{\text{relYP}} = \sqrt{U_{\text{relm1}}^2 + U_{\text{relm2}}^2 + U_{\text{relm3}}^2}。 \quad (4)$$

综上所述, 由式(4)求得: $U_{\text{relYP-维生素A}} = 0.001\ 31$, $U_{\text{relYP-维生素D}_3} = 0.006\ 38$, $U_{\text{relYP-维生素E}} = 0.001\ 31$ 。

$$U_{\text{relG}} = \sqrt{0.001\ 16^2 + 0.005\ 80^2 + 0.002\ 95^2 + 0.009\ 64^2 + 0.007\ 24^2 + 0.001\ 30^2} = 0.011\ 70。$$

3.2 标准物质引入的不确定度 U_{relBZ}

3.2.1 标准储备溶液引入的相对不确定度 U_{relC}

(1) 标准品引入的相对不确定度 U_{relC1} : 通过标准证书可知, 维生素 A、D₃、E 不确定度分别为 1% , 1% , 2% , 均匀分布, $K=2$, 则标准品引入的相对不确定度为:

$$U_{\text{relC1-维生素A}} = U_{\text{relC1-维生素D}_3} = 0.005\ 00;$$

$$U_{\text{relC1-维生素E}} = 0.010\ 00。$$

(2) 标准品称量引入的相对标准不确定度 U_{relC2} : 称取维生素 A、D₃ 和 E 标准品, 分别为 25.0 , 2.4 , 65.9 mg , 根据 3.1.2 得知, 电子天平 U_s 为 $0.000\ 057\ 7\text{ g}$, 根据式(5)求得其相对不确定度分别为: $U_{\text{relC2-维生素A}} = 0.002\ 31$, $U_{\text{relC2-维生素D}_3} = 0.024\ 16$, $U_{\text{relC2-维生素E}} = 0.000\ 88$ 。

$$U_{\text{relC2}} = \frac{U_s}{m}, \quad (5)$$

式中:

U_s ——电子天平标准不确定度, g ;

m ——称取的维生素 A、D₃ 和 E 标准品质量, mg 。

(3) 标准储备溶液定容引入的相对标准不确定度 U_{relC3} : 维生素 A 与 E 标准品均采用 50 mL 容量瓶, 维生素 D₃ 标准品需用 100 mL 容量瓶。样品制备引入的相对标准不确定度公式为:

$$U_{\text{relYP}} = \sqrt{U_{\text{relm1}}^2 + U_{\text{relm2}}^2 + U_{\text{relD}}^2}。 \quad (6)$$

根据表 3 数据并结合式(6), 则标准储备溶液定容引入的相对标准不确定度为:

$$U_{\text{relC3-维生素A}} = U_{\text{relC3-维生素E}} = 0.000\ 832;$$

$$U_{\text{relC3-维生素D}_3} = 0.000\ 833。$$

(4) 标准储备溶液的配制引入的相对标准不确定度: 样品制备引入的相对标准不确定度公式为:

$$U_{\text{relC}} = \sqrt{U_{\text{relC1}}^2 + U_{\text{relC2}}^2 + U_{\text{relC3}}^2}。 \quad (7)$$

由式(7)求得:

$$U_{\text{relC-维生素A}} = 0.005\ 70;$$

$$U_{\text{relC-维生素D}_3} = 0.024\ 69;$$

$$U_{\text{relC-维生素E}} = 0.010\ 07。$$

3.2.2 标准储备溶液稀释引入的相对标准不确定度 U_{relX}

标准储备液进行稀释时, 维生素 A、D₃ 分别用 2 mL 和 1 mL 移液管, 且都需 10 mL 容量瓶进行定容。根据表 4, 其稀释引入的不确定度为:

$$U_{\text{relX-维生素A}} = \sqrt{0.002\ 95^2 + 0.001\ 30^2} = 0.003\ 22;$$

$$U_{\text{relX-维生素D}_3} = \sqrt{0.004\ 09^2 + 0.001\ 30^2} = 0.004\ 29。$$

3.2.3 标准工作曲线引入的相对标准不确定度 U_{relG} 根据表 5 数据, 计算结果为:

表 2 样品定容引入的不确定度[†]

Table 2 Uncertainty introduced by the sample's fixed capacity

器皿	分布	最大允差/mL	体积误差不确定度	温度误差不确定度	标准不确定度	相对标准不确定度
1 mL 移液管	矩形分布	±0.007	0.004 04	0.000 60	0.004 08	0.004 08
5 mL 移液管		±0.015	0.008 66	0.003 00	0.009 16	0.001 83
2 mL 容量瓶		±0.015	0.008 66	0.001 20	0.008 74	0.004 37
10 mL 容量瓶		±0.020	0.011 55	0.006 12	0.013 07	0.001 31

[†] 玻璃器具已在 20 ℃校准,温度变化范围为(20±5) ℃^[14],水的膨胀系数为 2.08×10⁻⁴。

表 3 标准储备溶液定容引入的相对标准不确定度[†]

Table 3 Relative standard uncertainty introduced by constant volume of standard reserve solution

器皿	分布	最大允差/mL	体积误差不确定度	温度误差不确定度	标准不确定度	相对标准不确定度
50 mL 容量瓶	矩形分布	±0.05	0.028 86	0.030 0	0.004 16	0.000 832
100 mL 容量瓶		±0.10	0.057 74	0.060 0	0.083 27	0.000 833

[†] 玻璃器具已在 20 ℃校准,温度变化范围为(20±5) ℃^[14],水的膨胀系数为 2.08×10⁻⁴。

表 4 稀释引入的不确定度[†]

Table 4 The uncertainty of dilution introduction

器皿	分布	最大允差/mL	体积误差不确定度	温度误差不确定度	标准不确定度	相对标准不确定度
1 mL 移液管	矩形分布	±0.007	0.004 04	0.000 60	0.004 08	0.004 08
2 mL 移液管		±0.010	0.005 77	0.001 20	0.005 89	0.002 95
10 mL 容量瓶		±0.020	0.011 50	0.006 00	0.013 00	0.001 30

[†] 玻璃器具已在 20 ℃校准,温度变化范围为(20±5) ℃^[14],水的膨胀系数为 2.08×10⁻⁴。

表 5 标准曲线工作液制备引入的不确定度[†]

Table 5 Uncertainty in preparation of standard curve liquid

器皿	分布	吸取体积	最大允差	体积误差不确定度	温度误差不确定度	标准不确定度	相对标准不确定度
100 μL 移液枪	矩形分布	100 μL	±2 μL	1.154 7	0.060 04	1.156 25	0.001 16
		200 μL			0.120 08	1.160 92	0.005 80
		400 μL			0.240 17	1.179 41	0.002 95
		600 μL			0.360 26	5.784 73	0.009 64
1 000 μL 移液枪	分布	800 μL	±10 μL	5.773 5	0.480 32	5.793 45	0.007 24
		10.0 mL			0.006 00	0.013 00	0.001 30

[†] 玻璃器具已在 20 ℃校准,温度变化范围为(20±5) ℃^[14],水的膨胀系数为 2.08×10⁻⁴。

3.2.4 标准曲线引入的相对标准不确定度 U_{relQ} 分别配制 1, 2, 4, 6, 8 μg/mL 的维生素 A 标准溶液, 0.024, 0.048, 0.096, 0.144, 0.192 μg/mL 的维生素 D₃ 标准溶液, 13.18, 26.36, 52.72, 79.08, 105.44 μg/mL 的维生素 E 标准溶液进行测定, 每浓度测量两次, 采用最小二乘法拟合标准溶液的质量浓度与峰面积曲线, 数据见表 6。

S_y 为回归方程的标准偏差公式:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [y_i - (A_i x - B)]^2}{n - 2}}, \quad (8)$$

不确定度的计算公式:

$$U_Q = \frac{S_y}{A_i} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}, \quad (9)$$

表 6 校准曲线拟合数据

Table 6 The calibration curve fits the data

物质	最小二乘法回归曲线	试样平均浓度 $x_0 / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
维生素 A	$Y = 206\,726X - 10\,081.8$	4.647
维生素 D ₃	$Y = 274\,956X - 1\,054.86$	0.143
维生素 E	$Y = 8\,922.92X - 6\,568.60$	90.827

标准工作液曲线引入的相对标准不确定度:

$$U_{\text{relQ}} = \frac{U_Q}{x_0}, \quad (10)$$

式中:

A_i ——标准工作曲线斜率;
 B ——标准工作曲线截距;
 n ——标准工作液的测试次数, $n=10$;
 y_i ——不同浓度对应的峰的峰面积;
 P ——测试次数, $P=2$;
 $\bar{x}$ ——标准系列工作液的平均浓度;

根据表 6, 标准工作液曲线引入的相对标准不确定度为: $U_{\text{relQ-维生素A}} = 0.010\ 76$, $U_{\text{relQ-维生素D}_3} = 0.014\ 93$, $U_{\text{relQ-维生素E}} = 0.004\ 24$ 。

综上所述, 则标准物质引入的不确定度为:

$$\begin{aligned} &U_{\text{relBZ-维生素A}} = \sqrt{U_{\text{relC-维生素A}}^2 + U_{\text{relX-维生素A}}^2 + U_{\text{relG-维生素A}}^2 + U_{\text{relQ-维生素A}}^2} = 0.017\ 21; \\ &U_{\text{relBZ-维生素D}_3} = \sqrt{U_{\text{relC-维生素D}_3}^2 + U_{\text{relX-维生素D}_3}^2 + U_{\text{relG-维生素D}_3}^2 + U_{\text{relQ-维生素D}_3}^2} = 0.031\ 66; \\ &U_{\text{relBZ-维生素E}} = \sqrt{U_{\text{relC-维生素E}}^2 + U_{\text{relX-维生素E}}^2 + U_{\text{relG-维生素E}}^2 + U_{\text{relQ-维生素E}}^2} = 0.016\ 00. \end{aligned}$$

3.3 重复性试验的不确定度 U_{relCF}

称取同一批次的婴幼儿米粉, 进行 6 次平行试验, 同时进行前处理, 在相同的高效液相色谱条件下平行测定

定容后试样液中维生素 A、D₃ 和 E 的浓度, 呈正态分布, 采用极差法, 结果见表 7。

单次试验测量的标准偏差公式为:

$$S(\bar{X}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (11)$$

两次测定婴幼儿营养米粉中维生素 A、D₃、E 含量的平均值的相对标准不确定度公式为:

$$U_{\text{relCF}} = \frac{S(\bar{X})}{\bar{X}\sqrt{2}} \quad (12)$$

根据表 7 计算重复性试验的不确定度为:

$$\begin{aligned} U_{\text{relCF-维生素A}} &= 0.003\ 84, U_{\text{relCF-维生素D}_3} = 0.021\ 70, \\ U_{\text{relCF-维生素E}} &= 0.005\ 15. \end{aligned}$$

3.4 回收率引入的相对标准不确定度 U_{relHS}

准确称取约 5.000 g 婴幼儿营养米粉固体, 加入维生素 A、D₃ 和 E 各 3 个浓度梯度进行回收率的测定。但由于试样酶解不完全、皂化不完全, 石油醚萃取和蒸馏浓缩操作不当、基质的干扰等, 导致维生素 A、D₃ 和 E 的损失, 则婴幼儿米粉中维生素 A、D₃ 和 E 不能 100% 的进入测定中。本底样品 6 次数据见表 8。

根据表 9~11 回收率数据, 维生素 A、D₃ 和 E 平均回收率 R 分别为 93.177%, 87.815%, 95.539%, 回收率的标准偏差 S 分别为 3.94%, 4.75%, 3.03%。根据相对标准

表 7 试验数据及分析结果

Table 7 Experimental data and analysis results

样品	编号	质量/g	试样质量浓度 $C/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	试样平均质量浓度 $\bar{C}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	试样含量 $X/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	试样含量平均值 $\bar{X}/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	$S(\bar{X})$	U_{relCF}
维生素 A	1	5.001 8	4.663 0	4.647 0	9.320 0	9.295 0	0.050 50	0.003 84
	2	5.006 2	4.680 0		9.350 0			
	3	5.009 3	4.619 0		9.220 0			
	4	5.000 1	4.640 0		9.280 0			
	5	5.006 4	4.648 0		9.340 0			
	6	5.001 1	4.631 0		9.260 0			
维生素 D ₃	1	5.005 0	0.142 0	0.143 0	0.113 5	0.114 0	0.003 50	0.021 70
	2	5.008 1	0.136 0		0.108 6			
	3	5.001 2	0.148 0		0.118 4			
	4	5.004 8	0.140 0		0.111 9			
	5	5.000 1	0.145 0		0.116 0			
	6	5.001 5	0.145 0		0.166 0			
维生素 E	1	5.001 8	90.680 0	90.830 0	181.300 0	0.181 5	0.001 32	0.005 15
	2	5.006 2	91.570 0		182.900 0			
	3	5.009 3	90.170 0		180.000 0			
	4	5.000 1	90.240 0		180.500 0			
	5	5.006 4	91.790 0		183.300 0			
	6	5.001 1	90.510 0		181.000 0			

表 8 本底样品 6 次数据
Table 8 Data on the sample six times at this background

物质	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)						平均值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
维生素 A	0.117	0.119	0.119	0.115	0.116	0.117	0.117	1.37
维生素 D ₃	0.042	0.045	0.040	0.044	0.040	0.041	0.042	4.99
维生素 E	42.680	42.581	42.660	42.641	42.639	42.611	42.635	0.08

表 9 维生素 A 加标回收率数据
Table 9 V_A plus recovery rate data

序号	质量/g	加标量/ μg	定容体积/mL	测得含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率 $R/\%$	回收率标准偏差 $S/\%$
1	5.001 3	10	10	2.05	90.90	93.177	3.94
2	5.001 9	10	10	2.06	91.20		
3	5.008 3	10	10	2.16	96.60		
4	5.002 5	10	10	2.08	92.50		
5	5.002 6	10	10	2.26	101.4		
6	5.001 7	10	10	2.33	105.0		
7	5.005 0	20	10	4.27	101.1		
8	5.008 1	20	10	4.20	99.20		
9	5.001 2	20	10	3.89	91.45		
10	5.004 8	20	10	3.88	91.15		
11	5.000 1	20	10	3.91	92.10		
12	5.001 5	20	10	3.95	93.05		
13	5.001 8	50	10	9.32	90.92		
14	5.006 2	50	10	9.35	91.26		
15	5.009 3	50	10	9.22	90.04		
16	5.000 1	50	10	9.28	90.46		
17	5.006 4	50	10	9.34	90.62		
18	5.001 1	50	10	9.26	90.28		

表 10 维生素 D₃ 加标回收率数据
Table 10 V_{D₃} plus-labeled recovery rate data

序号	质量/g	加标量/ μg	定容体积/mL	测得含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率 $R/\%$	回收率标准偏差 $S/\%$
1	5.001 3	0.232	5	0.076 8	93.10	87.815	4.75
2	5.001 9	0.232	5	0.076 0	91.38		
3	5.008 3	0.232	5	0.071 9	82.76		
4	5.002 5	0.232	5	0.074 4	87.93		
5	5.002 6	0.232	5	0.080 0	100.0		
6	5.001 7	0.232	5	0.075 2	89.66		
7	5.005 0	0.464	5	0.113 5	86.20		
8	5.008 1	0.464	5	0.108 6	81.03		
9	5.001 2	0.464	5	0.118 4	91.38		
10	5.004 8	0.464	5	0.111 9	84.48		
11	5.000 1	0.464	5	0.116 0	88.79		
12	5.001 5	0.464	5	0.116 0	88.79		
13	5.001 8	0.580	5	0.129 6	82.76		
14	5.006 2	0.580	5	0.131 8	84.83		
15	5.009 3	0.580	5	0.138 9	91.03		
16	5.000 1	0.580	5	0.136 0	88.28		
17	5.006 4	0.580	5	0.130 2	83.45		
18	5.001 1	0.580	5	0.130 2	84.83		

表 11 维生素 E 加标回收率数据
Table 11 V_E plus recovery rate data

序号	质量/g	加标量/ μg	定容体积/mL	测得含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	回收率/%	平均回收率 $R/\%$	回收率标准偏差 $\bar{S}/\%$
1	5.001 3	65.90	10	48.983	96.33	95.539	3.03
2	5.001 9	65.90	10	49.608	105.8		
3	5.008 3	65.90	10	48.761	92.96		
4	5.002 5	65.90	10	48.996	96.53		
5	5.002 6	65.90	10	49.062	97.53		
6	5.001 7	65.90	10	49.222	99.95		
7	5.005 0	263.6	10	67.459	94.17		
8	5.008 1	263.6	10	67.822	95.55		
9	5.001 2	263.6	10	68.078	96.52		
10	5.004 8	263.6	10	67.544	94.50		
11	5.000 1	263.6	10	68.890	99.60		
12	5.001 5	263.6	10	69.467	101.8		
13	5.001 8	527.2	10	90.686	91.14		
14	5.006 2	527.2	10	91.570	92.82		
15	5.009 3	527.2	10	90.172	90.17		
16	5.000 1	527.2	10	90.239	90.30		
17	5.006 4	527.2	10	91.788	93.23		
18	5.001 1	527.2	10	90.509	90.80		

不确定度公式 $U_{\text{relHS}} = \frac{S(R)}{\sqrt{n} \times R}$ 对回收率引入的相对标准
不确定度进行计算。

则: $U_{\text{relHS-维生素A}} = 0.009\ 90$; $U_{\text{relHS-维生素A}} = 0.012\ 70$;
 $U_{\text{relHS-维生素E}} = 0.007\ 47$ 。

为了判断是否引进回收率校正因子 R , 在实际计算
时, 需要对回收率进行显著性分析^[15]。

将数据代入式(13), 则 $T_{\text{维生素A}} = 6.891\ 9$; $T_{\text{维生素D}_3} =$
 $9.552\ 9$; $T_{\text{维生素E}} = 5.791\ 9$, 根据 t 检验临界值分布表, 当
自由度 $f=4$ 时, 查 t 临界值分布表^[16], $t_{(0.05,4)} = 2.776\ 0$ 。
根据试验结果, $T_{\text{维生素D}_3} > T_{\text{维生素A}} > T_{\text{维生素E}} > 2.776$, 因此
计算需要引入校正因子。

$$T = \left| \frac{1 - \bar{R}}{U_{\text{relHS}}} \right|。 \tag{13}$$

3.5 合成标准不确定度

合成标准不确定度计算公式如式(14)所示。

$$U_{\text{relHC}} = \sqrt{U_{\text{relYP}}^2 + U_{\text{relBZ}}^2 + U_{\text{relCF}}^2 + U_{\text{relHS}}^2}。 \tag{14}$$

根据式(14)且结合数据, 合成标准标准不确定度计
算结果如表 12 所示。

3.6 扩展不确定度

在置信概率 95% 时, $K=2$, 则扩展不确定度为:

$$U_{\text{rel维生素A}} = K \times U_{\text{relHC-维生素A}} \times \bar{X}_{\text{维生素A}} = 0.188\ 4;$$

$$U_{\text{rel维生素D}_3} = K \times U_{\text{relHC-维生素D}_3} \times \bar{X}_{\text{维生素D}_3} = 0.009\ 3;$$

$$U_{\text{rel维生素E}} = K \times U_{\text{relHC-维生素E}} \times \bar{X}_{\text{维生素E}} = 0.006\ 7。$$

表 12 各相对标准不确定度

Table 12 Relative standard uncertainties

物质	U_{relYP}	U_{relBZ}	U_{relCF}	U_{relHS}	U_{relHC}
维生素 A	0.001 31	0.017 21	0.003 84	0.009 90	0.020 26
维生素 D ₃	0.006 38	0.031 66	0.021 70	0.012 70	0.040 90
维生素 E	0.001 31	0.016 00	0.005 15	0.007 47	0.018 44

3.7 测量不确定度报告

高效液相色谱仪同时对婴幼儿营养米粉中维生素
A、D₃ 和 E 含量进行测定, 结果为:

$$X_{\text{维生素A}} = (9.250\ 0 \pm 0.188\ 4)\ \mu\text{g/g} (K=2);$$

$$X_{\text{维生素D}_3} = (0.114\ 0 \pm 0.009\ 3)\ \mu\text{g/g} (K=2);$$

$$X_{\text{维生素E}} = (0.1815 \pm 0.006\ 7)\ \mu\text{g/g} (K=2)。$$

4 结论

采用高效液相色谱法同时对婴幼儿营养米粉中维生素
A、D₃ 和 E 进行测定, 当取样量为 5.000 g 时, 样品中维生素
A、D₃ 和 E 扩展不确定度为 0.188 4, 0.009 3, 0.006 7 $\mu\text{g/g}$, 测
定含量为 $(9.250\ 0 \pm 0.188\ 4)$, $(0.114\ 0 \pm 0.009\ 3)$,
 $(0.181\ 5 \pm 0.006\ 7)\ \mu\text{g/g}$ 。

结合试验过程及计算结果可知, 婴幼儿米粉中维生
素 A、D₃ 和 E 的最终结果的不确定度主要是由标准溶液
储备液配制、标准工作曲线拟合和回收率引起的。因此,
选择最佳试验条件、采用高精密度仪器、定期维护及保养

设备、改善试验方法和规范试验操作对提高试验结果的准确性至关重要。

参考文献

- [1] 吕倩, 邓泽新, 吴颖, 等. 婴幼儿营养米粉加工过程中营养素损耗研究[J]. 粮食与饲料工业, 2018(8): 7-9, 17.
 - [2] HAMMERLING U. Retinol as electron carrier in redox signaling, a new frontier in vitamin A research [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2016, 5(1): 1 528.
 - [3] 黄成安, 张喜金, 潘拾朝, 等. 高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3 034-3 037.
 - [4] DELUCA H. New concepts of vitamin D functions [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 669(9): 59-68.
 - [5] SHAHROKHI S Z, GHAFARI F, KAZEROONI F. Role of vitamin D in female reproduction[J]. Clin Chim Acta, 2016, 455: 3 338.
 - [6] ZHANG Zi-feng, FAN Shao-hua, ZHENG Yuan-lin. Purple sweet potato color attenuates oxidative stress and inflammatory response induced by D-galactose in mouse liver[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(2): 496-501.
 - [7] 霍晓敏. 气相色谱法对干海参中的六六六、滴滴涕测量结果不确定度的评定[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 244-248.
 - [8] KERRIE L Kaspar, JEAN Soon Park, CHARLES R Brown, et al. Pigmented potato consumption alters oxidative stress and inflammatory damage in men[J]. The Journal of Nutrition, 2011, 141(1): 1-4.
 - [9] AHMED S, KISHIKAWA N, OHYAMA K, et al. Selective chemiluminescence method for monitoring of vitamin K homologues in rheumatoid arthritis patients[J]. Talanta, 2011, 85: 230-236.
 - [10] PYKA A, NABIALKOWSKA D, BOBWR K, et al. Comparison of NP-TLC and RP-TLC with densitometry to quantitative analysis of tocopherol acetate in pharmaceutical preparation[J]. J Liq Chromatogr R T, 2011, 34: 2 548-2 564.
 - [11] PALAKOV E M, CROW B S, BISHOP M J, et al. Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection[J]. J Chromatogr B, 2009, 877: 8 994.
 - [12] 樊垚, 黄翠丽, 王力清, 等. 超高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中的 V_{D_3} 含量的不确定度评定[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 143-146.
 - [13] SEMERARO A, ALTIERI I, PATRIARCA M, et al. Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: An application to the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC[J]. J Chromatography B, 2009, 877(11): 1 209-1 215.
 - [14] 杨洋, 徐春祥, 车文军. 高效液相色谱法测定奶粉中的三聚氰胺及其不确定度分析[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 250-253.
 - [15] 周荣杰, 葛城, 易灿, 等. 评定高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的不确定度[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1 635-1 641.
 - [16] 杨德毅, 刘莉, 吾建祥, 等. 高效液相色谱测定佛手中联苯腈酯残留量的不确定度评定[J]. 农药, 2019, 58(2): 125-129.
-
- (上接第 84 页)
- [2] 李超, 袁湘云, 李达, 等. 烙铁温度对成品烟丝致香成分的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 27-31, 36.
 - [3] 周志华. 机器学习[M]. 北京: 清华大学出版社, 2016: 53-72, 97-120.
 - [4] 孙文洁, 武强, 董东林, 等. 矿井水文地质类型划分的 Fisher 判别分析法: 以开滦矿区为例[J]. 中国矿业大学学报, 2012, 41(2): 231-235.
 - [5] 孙俊, 蒋淑英, 毛罕平, 等. 基于线性判别法的生菜农药残留定性检测模型研究[J]. 农业机械学报, 2016, 47(1): 239-244.
 - [6] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法: YC/T 159—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 399-401.
 - [7] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 氯的测定 连续流动法: YC/T 162—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 415-419.
 - [8] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 钾的测定 连续流动法: YC/T 217—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 1-3.
 - [9] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法: YC/T 161—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 1-3.
 - [10] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 蛋白质的测定 连续流动法: YC/T 249—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 1-8.
 - [11] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 烟碱的测定 连续流动法: YC/T 246—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-7.
 - [12] 孟凡奇, 李广杰, 李明, 等. 逐步判别分析法在筛选泥石流评价因子中的应用[J]. 岩土力学, 2010, 31(9): 2 925-2 929.
 - [13] 于秀林. 多元统计分析[M]. 北京: 中国统计出版社, 2002: 125-128.
 - [14] 姜春露, 姜振泉, 孙强, 等. 基于 Fisher 判别分析法的无粘性土渗透破坏类型判别[J]. 应用基础与工程科学学报, 2012(5): 81-88.