

高效液相色谱法测定植物油中游离棉酚的不确定度评定

Uncertainty evaluation for determination of free gossypol in vegetable oil by high performance liquid chromatography

龙锦林¹ 王春丽² 陶银凤² 孙晓晗¹ 李 烁¹

LONG Jin-lin¹ WANG Chun-lin² TAO Yin-feng² SUN Xiao-han¹ LI Shuo¹

(1. 济南市食品药品检验检测中心, 山东 济南 250102;

2. 山东城控检测技术有限公司, 山东 济南 250102)

(1. Jinan Center for Food and Drug Control, Jinan, Shandong 250102, China;

2. Shandong Chengkong Testing Technongogy Co., Ltd., Jinan, Shandong 250102, China)

摘要:依据植物油中游离棉酚的检测方法,建立了一种植物油中游离棉酚检测结果不确定度的数学模型,并对其检测过程中产生不确定度的主要来源进行了分析与评定。结果表明:高效液相色谱仪的性能、样品前处理的重复性和标准曲线的拟合对游离棉酚检测结果的不确定度的贡献较大,当植物油中游离棉酚含量为 48 mg/kg 时,其扩展不确定度为 5 mg/kg ($k=2$)。

关键词: 高效液相色谱; 植物油; 不确定度; 游离棉酚

Abstract: According to the detection method of free gossypol in vegetable oil, this paper establishes a mathematical model of uncertainty evaluation for determination of free gossypol in vegetable oil. The main sources of uncertainty in measurement arising from procedure of testing were analyzed and evaluated. The evaluation results showed that the fitting of standard curve, the performance of liquid chromatograph and the repeatability of sample pretreatment made great contribution to the uncertainty of free gossypol detection results. When the content of free gossypol in edible oil was 48 mg/kg, the expanded uncertainty was 5 mg/kg ($k=2$).

Keywords: high performance liquid chromatography; vegetable oil; uncertainty; free gossypol

游离棉酚是一种多酚羟基萜类化合物,主要存在于未精炼或精炼不彻底的棉籽油中,由于存在具有活性的醛基和羟基而具有较强的毒性^[1]。中国国家标准规定:食用植物油中游离棉酚的最大限量为 200 mg/kg^[2]。

因此在各级食品安全监督检验中,游离棉酚是植物油产品中一个重要的监控指标。不确定度是表征合理地赋予测量值的分散性^[3],以便使用人员能够评价测量值的可靠程度^[4],因此游离棉酚检测的不确定度是一个涉及评价中国植物油质量安全的重要参数。目前有关游离棉酚含量的检测研究较多^[5-7],但未对其检查结果的不确定度进行评定。

同时,食品检验检测机构应根据需要建立和保持应用测量不确定度的程序^[8],并在测量不确定度影响符合性判定等情况时,检验报告中给出测量结果的不确定度^[9]。文章拟通过 GB 5009.148—2014《食品安全国家标准 植物性食品中游离棉酚的测定》测定植物油中游离棉酚,并依据不确定度评估的相关标准与规范^[10-11],建立一种植物油中游离棉酚检测结果不确定度的数学模型,对游离棉酚检测过程中产生不确定度的主要来源进行分析与评定,旨在为评估植物油中游离棉酚检测结果的质量提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

食用植物油:市售;
棉酚标准品:≥95%,中国药品生物制品检定所;
磷酸、无水乙醇、丙酮:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;
甲醇:色谱纯,美国 Fisher 公司;
高效液相色谱仪:Waters e2695 型,美国沃特世公司;
电子天平:BSA2245 型,德国赛多利斯公司;
电子天平:CPA2250 型,德国赛多利斯公司。

1.2 试验方法

依据 GB 5009.148—2014 对植物油中游离棉酚进行

作者简介:龙锦林(1979—),男,济南市食品药品检验检测中心高级工程师,硕士。E-mail:377101574@qq.com

收稿日期:2021-02-01

检测。称取油样 1.00 g 于 15 mL 离心试管中,加入 5 mL 无水乙醇,涡旋 5 min,冷藏静置分层(1 h 以上),取上清液于 2 mL 离心管,14 000 r/min 离心 5 min,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,上机检测。

2 数学模型

建立如式(1)所示的模型:

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

式中:

X ——试样中棉酚含量,mg/kg;

m ——试样质量,g;

C ——试样测定液中棉酚含量, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

V ——萃取用无水乙醇体积,mL。

3 不确定度主要来源

从不确定度的传播律来看,数学模型中各参数都可能有一个与检测结果相关的不确定度,都是检测结果不确定度的潜在来源^[12]。从数学模型和测量过程可知,游离棉酚检测结果不确定度主要来自:① 样品称量过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$;② 萃取溶剂移取过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$;③ 样液中游离棉酚浓度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$,包括标准物质本身含量、标准物质配制过程使用的容器、校准曲线拟合、样液中游离棉酚峰面积的重复性;④ 样品均匀性及其前处理过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(p)$ 。

为了简化不确定度评估程序,降低评估工作量,根据不确定度评估中“抓大放小”的原则,在评估过程中,对于贡献率较小的因素,尤其是贡献率小于最大影响因素 1/10 的因素,则不加以计算评估^[9]。由于检测环境温度对检测结果的贡献较小^[13-14],因此不讨论室温对检测结果不确定度的影响。

4 结果与分析

4.1 样品称量引入的不确定度

混匀后直接使用电子天平称取 1.00 g 油样,电子天平最大质量允差为 0.5 mg,按正态分布考虑, $k=3$ 。则由样品称量引入的标准不确定度为:

$$u(m) = \frac{\Delta y}{3} = \frac{0.5}{3} = 1.67 \times 10^{-4} \text{ g}。$$

$$\text{相对标准不确定度 } u_{\text{rel}}(m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{1.67 \times 10^{-4}}{1.0} = 1.67 \times 10^{-4}。$$

4.2 萃取体积引入的不确定度

油样中用 5.0 mL 乙醇萃取棉酚,依据 JJG 646—2006 的要求:移液器的容量允许差为 0.6%,按矩形分布考虑, $K=\sqrt{3}$ 。则由萃取溶剂体积引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V) = \frac{0.6\%}{\sqrt{3}} = 3.46 \times 10^{-3}。$$

4.3 样液中游离棉酚浓度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$

样液中游离棉酚浓度引入的不确定度主要来源于标准物质本身含量、标准物质配制、校准曲线拟合和样液中游离棉酚峰面积的重复性 4 个方面。

4.3.1 标准物质本身引入的不确定度 根据棉酚标准物质证书提供的信息,游离棉酚的纯度为 $(97.0 \pm 1.0)\%$;按矩形分布考虑, $K=\sqrt{3}$,其相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(s_{\text{std}}) = \frac{1.0\%}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}。$$

4.3.2 标准物质配制引入的标准不确定度

(1) 称量标准物质引入的标准不确定度:标准物质称样量为 0.200 00 g,天平检定最大质量允差为 0.05 mg,其置信区间 $p=0.99$,按正态分布考虑, $k=3$ 。

$$\text{则标准不确定度 } u(m_{\text{std}}) = \frac{\Delta y}{3} = \frac{0.05}{3} = 1.67 \times 10^{-5} \text{ g}。$$

$$\text{相对标准不确定度 } u_{\text{rel}}(m_{\text{std}}) = \frac{u(m_{\text{std}})}{m} = \frac{1.67 \times 10^{-5}}{0.2} = 8.35 \times 10^{-5}。$$

(2) 标准储备溶液定容引入的不确定度:标准储备液、中间标准液制备过程中使用了 100 mL 容量瓶、10 mL 容量瓶和 500 μL 移液器。

① 按照 JJG 196—2006 的要求,100 mL 容量瓶(A 级)的最大允差为 ± 0.1 mL,按矩形分布考虑, $K=\sqrt{3}$,其相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{100}) = \frac{0.1}{100 \times \sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-4}$;

② 按照 JJG 196—2006 的要求,10 mL 容量瓶(A 级)的最大允差为 ± 0.02 mL,按矩形分布考虑, $K=\sqrt{3}$,其相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{10}) = \frac{0.02}{10 \times \sqrt{3}} = 1.15 \times 10^{-3}$;

③ 按照 JJG 646—2006 的要求,500 μL 移液器的容量允许差为 1.0%,按矩形分布考虑, $K=\sqrt{3}$,其相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{0.5}) = \frac{0.5 \times 1.0\%}{0.5 \times \sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}$ 。

因此标准储备溶液的定容和移取引入的相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{std}}) = \sqrt{(5.77 \times 10^{-4})^2 + (1.15 \times 10^{-3})^2 + (5.77 \times 10^{-3})^2} = 5.91 \times 10^{-3}。$$

故棉酚标准溶液配制引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{std}}) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(m_{\text{std}})]^2 + [u_{\text{rel}}(V_{\text{std}})]^2} = 5.91 \times 10^{-3}。$$

4.3.3 校准曲线拟合校准引入的不确定度 按照试验方法的要求,使用高效液相色谱仪对 1,5,10,20,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液进行测定,每个水平重复测量 3 次,得到标准物质峰面积,各浓度的峰面积见表 1。以浓度 X 为横坐标,

表 1 标准物质峰面积

Table 1 Peak area of reference materials

序号	棉酚质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	1	5	10	20	40
1	76 679.38	379 491.70	765 117.43	1 555 682.73	3 176 389.59
2	77 459.43	380 589.18	770 955.03	1 555 075.46	3 177 099.23
3	79 097.30	382 230.09	759 754.73	1 555 546.89	3 176 844.96
平均值	77 745.37	380 770.32	765 275.73	1 555 480.31	3 176 777.93

峰面积的平均值 Y 为纵坐标绘制标准曲线,建立线性回归方程 $Y=7.96e+004X-18\ 827, R^2=0.999$ 。

按式(2)计算标准曲线拟合引入的不确定度。

$$u(C_{\text{cal}}) = \frac{S(A)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_i - \bar{C})^2}{S_{\text{cc}}}}, \quad (2)$$

式中:

$S(A)$ ——标准工作液峰面积残差的标准偏差;

b ——拟合标准曲线的斜率;

p ——样品的测量次数;

n ——拟合标准曲线中标准点个数;

C_i ——标准系列质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

$\bar{C}$ ——标准系列质量浓度的平均值, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

S_{cc} ——溶液含量残差的平方和。

植物油样品测量重复 6 次,使用线性方程求得使用样液中游离棉酚含量为 $9.64 \mu\text{g}/\text{mL}$,则标准曲线拟合引入的相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{cal}}) = \frac{u(C_{\text{cal}})}{C} = \frac{0.136\ 0}{9.64} = 0.014\ 1。$$

4.3.4 样液中棉酚峰面积引入的不确定度 试样处理液峰面积测量的不确定度主要是高效液相色谱仪引入的不确定度;查高效液相色谱仪检定证书得知,当 $k=2$ 时,液相色谱仪引入的相对不确定度为 $u_{\text{rel}}(A) = 0.04$ 。

综上,样液中游离棉酚浓度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$ 为:

$$u_{\text{rel}}(C) = \sqrt{(5.77 \times 10^{-3})^2 + (5.91 \times 10^{-3})^2 + 0.014\ 1^2 + 0.04^2} = 0.043\ 2。$$

4.4 样品处理过程中重复性引入的不确定度

检测结果的重现性主要受样品的均匀性和样品前处理过程的一致性,以及检测操作环境等因素影响,样品前处理的重复性引入的不确定度可以用检测结果的精密度来评估与表示^[10]。基于标准方法验证的需要,试验所采用的济南市市监督抽检的植物油的游离棉酚含量低于标准检测限($<2.5 \text{ mg}/\text{kg}$),同时采用 $50 \text{ mg}/\text{kg}$ 作为添加质量浓度代替样品的测试结果(见表 2)。由表 2 可知,加标样品测定结果的精密度为 1.79% ,平均回收率为 96.36% 。

表 2 样品测定结果的精密度和回收率

Table 2 The precision and recovery rate of the sample determination result

测量次数	样液质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测结果/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/%
1	9.58	47.90	95.80
2	9.38	46.90	93.80
3	9.54	47.70	95.40
4	9.68	48.40	96.80
5	9.80	49.00	98.00
6	9.84	49.20	98.40
平均值	9.64	48.18	96.36
RSD/%		1.79	/

则样品前处理的重复性引入的不确定度为:

$$u(p) = S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.861。$$

$$\text{相对标准不确定度 } u_{\text{rel}}(p) = \frac{u(p)}{\bar{x}} = \frac{0.861}{48.18} = 0.017\ 9。$$

4.5 合成标准不确定度

基于不确定度的传播规律,游离棉酚检测结果的不确定度可以通过各个分量的不确定度合成得到。由于游离棉酚检测结果是各分量的乘积,且各分量是互不相关,因此按式(3)计算测量结果的不确定度^[7]。

$$\frac{u_c(x)}{\bar{x}} = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V) + u_{\text{rel}}^2(C) + u_{\text{rel}}^2(p)}。 \quad (3)$$

则

$$\frac{u_c(x)}{\bar{x}} = \sqrt{(1.67 \times 10^{-4})^2 + (3.46 \times 10^{-3})^2 + 0.043\ 2^2 + 0.017\ 9^2} = 0.046\ 9。$$

$$u_c(x) = 0.046\ 9 \times 48.18 = 2.3。$$

4.6 扩展不确定度及其报告

扩展不确定度可由合成标准不确定度乘以包含因子,取置信区间 $p=95\%$,则 $k=1.96$,约为 $2^{[10]}$,因此植

物油中游离棉酚含量测定的扩展不确定度 $U(x) = 2.3 \times 2 = 4.6 \text{ mg/kg}$ 。

根据 GB 5009.148—2014 中检出结果有效保留位数等要求,最终植物油中游离棉酚含量测定结果的报告为:

$$C = (48 \pm 5) \text{ mg/kg } (K=2)。$$

5 结论

通过对植物油中游离棉酚含量的检测,分析和评定了游离棉酚检测过程中的不确定度主要来源,并计算出检测结果的扩展不确定度。结果表明,植物油中游离棉酚含量检测结果不确定度的重要来源为高效液相色谱仪的性能、样品前处理的重复性以及标准曲线拟合。因此在植物油中游离棉酚检测过程中,要做好高效液相色谱仪的性能维护与监控并加以控制;完善标准曲线的配置,做好标准物质的有效核查;加大检测人员培训,完善和规范检测程序,确保人员操作的规范性和一致性。

参考文献

- [1] CORINNA K, HANNA M, HEIDEL F, et al. Gossypol toxicity and detoxification in *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 78: 69-77.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 植物油: GB 2716—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1-3.
- [3] 中国标准化委员会. 化学分析测量不确定度评定: JJF 1135—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005: 1-12.
- [4] 中国国家标准化管理委员会. 测量不确定度的评定与表示通

用要求: GB/T 24718—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 1-76.

- [5] 唐吉旺, 何浩, 王淑霞, 等. 固相萃取—高效液相色谱—串联质谱法同时测定动物源性食品中五氯酚和游离棉酚[J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 364-371.
- [6] 王雅朦, 郭咪咪, 魏征, 等. 食用植物油中痕量游离棉酚的超高效液相色谱—串联质谱测定[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(4): 126-132.
- [7] 邸万山. 高效液相色谱内标法测定棉籽油中游离棉酚[J]. *中国油脂*, 2016(6): 97-99.
- [8] 中国认证认可监督管理委员会. 检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求: RB/T 214—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 1-10.
- [9] 中国合格评定国家委员会. 测量不确定度的要求: CNAS-CL01-G003—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 1-6.
- [10] 中国标准化委员会. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 1-53.
- [11] 中国合格评定国家委员会. 测量不确定度要求的实施指南: CNAS-GL05—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 1-7.
- [12] 中国合格评定国家委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL06—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 1-137.
- [13] 袁河, 肖晓义, 刘佳, 等. 高效液相色谱法测定食用槟榔中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的不确定度评定[J]. *食品与机械*, 2020, 36(8): 77-80.
- [14] 黄坤, 王会霞, 范小龙, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定炒货中组胺含量的不确定度评定[J]. *食品与机械*, 2019, 35(8): 64-68.

(上接第 71 页)

- [6] 苏赋, 吕沁, 罗仁泽. 基于深度学习的图像分类研究综述[J]. *电信科学*, 2019, 35(11): 58-74.
- [7] 侯一民, 周慧琼, 王政一. 深度学习在语音识别中的研究进展综述[J]. *计算机应用研究*, 2017, 34(8): 2 241-2 246.
- [8] 赵为. 基于深度学习的电子鼻白酒识别方法研究[D]. 天津: 天津大学, 2018: 29-51.
- [9] 邱锡鹏. 神经网络与深度学习[J]. *中文信息学报*, 2020, 34(7): 4.
- [10] 张宪超. 深度学习: 上[M]. 北京: 科学出版社, 2019: 1-37.
- [11] 张向荣. 模式识别[M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2019: 89-103.

(上接第 75 页)

- [11] D21 Initiative. D21-qualitätskriterien für internetangebote[EB/OL]. (2018-04-20) [2021-04-13]. https://initiated21.de/app/uploads/2019/08/d21-qualitaetskriterien_2018.pdf.
- [12] 中华人民共和国商务部网站. 德国网络零售情况[EB/OL]. (2012-05-16) [2021-04-13]. <http://www.mofcom.gov.cn/aarticle/i/dxfw/jlyd/201205/20120508127788.html>.

- [12] 万磊, 佟鑫, 盛明伟, 等. Softmax 分类器深度学习图像分类方法应用综述[J]. *导航与控制*, 2019, 18(6): 1-9, 47.
- [13] 高晗, 田育龙, 许封元, 等. 深度学习模型压缩与加速综述[J]. *软件学报*, 2021, 32(1): 68-92.
- [14] BYUNG J K. Improved deep learning algorithm[J]. *Journal of Advanced Information Technology and Convergence*, 2018, 8(2): 119-127.
- [15] 李恒. 基于深度学习过拟合现象的分析[J]. *中国科技信息*, 2020(14): 90-91.
- [16] 韩梦娇. 基于选择性区域丢弃的 dropout 方法研究与实现[D]. 成都: 电子科技大学, 2020: 21-36.

- [13] 罗辉. 中国食品安全监管的问题审视与机制向度[J]. *食品与机械*, 2019, 35(8): 100-103.
- [14] 李文娟, 刘桂锋, 卢章平. 基于专利分析的我国大数据产业技术竞争态势研究[J]. *情报杂志*, 2015(7): 65-70.
- [15] HOOKER C N H. HACCP as an international trade standard[J]. *American Journal of Agricultural Economics*, 1996, 78(3): 775-779.