

实验技术与方法

饮料中咖啡因测定结果的不确定度评估

胡建英

(宁夏回族自治区疾病预防控制中心理化科,宁夏 银川 750004)

摘要:目的 对 HPLC 法测定饮料中咖啡因含量的不确定度进行评估;并通过对不确定度的分析,为方法的改进和找到实验中关键控制点提供依据。方法 依据 JJF 1059—1999《测量不确定度评定与表示》,找出测量过程中影响不确定度的因素,进行评估和合成。结果 对 HPLC 法测定饮料中的咖啡因给出了测定不确定度为 2.2 μg/ml。结论 通过对使用标准曲线法定量的测量方式中不确定度的计算,找到工作中的关键步骤,对提高测量的质量有指导意义。

关键词:不确定度; HPLC 法; 咖啡因

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)02-0136-03

Determination of Caffeine in Beverages of Uncertainty in Measurement

HU Jian-ying

(Ningxia Hui Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Ningxia Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective The uncertainty evaluation of caffeine in beverages was measured by HPLC method, and the uncertainty was analyzed for providing a good reference for improving determination method and finding the key steps in determination. **Method** In accordance with JJF-1059-1999 method, finding the factors which impacts the uncertainty evaluation in determination process, and the components of the uncertainty were evaluated and combined. **Results** The measurement uncertainty of caffeine in beverages by HPLC methods were evaluated (2.2 μg/ml). **Conclusion** Uncertainty in determination process was evaluated with a standard curve for quantity, which possesses guiding significance for finding the key steps in the job and improving determination quality in the future.

Key words: Uncertainty; HPLC; Caffeine

测量不确定度是指表征合理地赋予被测量值的分散性,与测量结果相联系的参数。在测量结果的完整表述中,应包括测量不确定度。随着国际贸易范围的逐步扩大,测量不确定度在国际上已广泛使用,这就要求测量结果的报告形式与国际接轨,以便各实验室间测量结果能相互认可,从而节约交易成本。本文通过对饮料中咖啡因测量过程中各个影响因素的分析和合成,计算测量不确定度,构成完整的测量结果表述,使测量结果的适用性更强。

1 方法与材料

1.1 方法

根据 GB/T 5009.139—2003《饮料中咖啡因的测定》,对样品中咖啡因的含量进行定性定量。依据 JJF 1059—1999《测量不确定度评定与表示》,找出测量过程中影响不确定度的因素,进行评估和

合成。

1.2 主要仪器设备和试剂

Agilent1100 液相色谱仪(具二极管阵列检测器);甲醇(保证试剂),己腈(色谱纯);咖啡因 GBW(E)100063 样品编号 09001;可乐饮料:市场采购。

2 结果与讨论

2.1 样品测量过程中被测量的不确定度的评估

建立被测量的数学模型
$$c_i = \frac{A_i - a}{b}$$

其中
$$c_i = \frac{c_0 \cdot V_1}{V_2}; c_0 = \frac{m \times p \times 1000}{v}$$

式中: c_i ——样品中咖啡因的含量(mg/L)

A_i ——与 c_i 对应的积

a, b ——校准曲线的截距和斜率

c_0 ——所配制标准溶液的浓度(mg/ml)

V_1 ——取标准溶液的体积(ml)

V_2 ——标准溶液稀释时定容的体积(ml)

m ——称取标准物质的质量(g)

P ——标准物的纯度

收稿日期:2009-08-21

作者简介:胡建英 主管检验师 研究方向为卫生检验 E-mail:

gaoyuan221@126.com

v ——配制标准溶液的体积 (ml)

2.2 配制校准用的标准溶液引入的不确定度的评估

2.2.1 标准溶液配制方法

称取编号 GBW(E)10063 咖啡因 0.025 52 g, 用甲醇溶解并定容至 50.0 ml, 上下反复颠倒 30 次。此过程引入不确定度分析如下:

使用 0.01mg 天平, 用减量法称量, 天平引入的不确定度:

$$u_{(m)} = \sqrt{2 \times \left(\frac{a}{k}\right)^2} = 0.081\ 65\text{mg}$$

$$u_r(m) = \frac{u(m)}{m} = 0.32\%$$

供应商提供标准物质的相对扩展不确定度为 0.2% ($k=2$),

$$u_{r(p)} = \frac{0.2\%}{2} = 0.1\%$$

标准溶液定容引入的不确定度分量:

使用 A 级 50ml 容量瓶定容, 容量瓶最大允差为 $\pm 0.05\text{ml}$,

$$u_{(v)} = \frac{0.05\ \text{ml}}{\sqrt{3}} = 0.0289\ \text{ml}$$

配制标准时, 室温偏离 $20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 引入不确定,

$$u(T) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 50.0}{\sqrt{3}} = 0.0303\ \text{ml}$$

根据以往经验定容时读数引入重复性误差 0.020 ml, 引入不确定度分量 0.020 ml,

$$u_c = \sqrt{u^2(V) + u^2(T) + u^2(rep)} = 0.0464\ \text{ml},$$

$$u_{rc}(V) = \frac{0.0464}{50} \times 100\% = 0.093\%$$

2.2.2 标准物质配制引入不确定度分量合式

$$u_{cr}(c_0) = \sqrt{u_{(m)}^2 + u_{(v)}^2 + u_{(p)}^2} = 0.35\%$$

所配制标准溶液浓度为:

$$c_0 = \frac{m \cdot p \times 1000}{V} = 0.5094\ \text{mg/ml},$$

$$u_{cr}(c_0) = \frac{u(c_0)}{c_0} = 0.35\%$$

$$u(c_0) = u_{cr}(c_0) \cdot c_0 = 0.35\% \times 0.5094 = 0.0018\ \text{mg/ml}$$

2.2.3 标准溶液浓度的完整表达: $(0.5094 \pm 0.0036)\ \text{mg/ml}$ $k=2$

2.3 标准系列溶液的配制

在标准系列溶液的配制过程中, 直线两端点的误差比中间点的误差大, 现取两端点中的一点计算其标准不确定度。

2.3.1 标准系列中单点的配制

取 0.5094 mg/ml 标准溶液 1.00 ml 于 25.0 ml 容

量瓶 (B 级) 中用纯水定容, 并上下颠倒混匀。

①校准: 对于 1.00 ml (A 级) 分度吸量管, 制造商给定的准确性范围为 $\pm 0.008\ \text{ml}$, 假定矩形分布标准不确定度:

$$\frac{0.008}{\sqrt{3}} = 0.0046\ \text{ml}$$

②温度: 在取标准溶液时, 由于温度缺乏控制而产生的不确定度 (假定温度的波动 $\pm 5^\circ\text{C}$)

$$\frac{1.00 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.0006\ \text{ml},$$

$$u(V_1) = 0.0046\ \text{ml}$$

$$u_r(V_1) = \frac{u(V_1)}{V_1} \times 100\% = 0.46\%$$

③校准: 对于 25.0 ml (B 级) 容量瓶, 制造商给定的准确性范围为 $\pm 0.06\ \text{ml}$, 假定矩形分布标准不确定度 $0.06/\sqrt{3} = 0.035\ \text{ml}$

④温度: 在标准溶液稀释时, 由于温度缺乏控制而产生的不确定度 (假定温度的波动 $\pm 5^\circ\text{C}$)

$$\frac{25.0 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.015\ \text{ml},$$

$$u(V_2) = \sqrt{0.015^2 + 0.035^2} = 0.038\ \text{ml}$$

$$u_r(V_2) = \frac{u(V_2)}{V_2} \times 100\% = 0.15\%$$

2.3.2 标准溶液配制及稀释标准溶液过程中不确定度的合成

$$\begin{aligned} u_r(c_i) &= \sqrt{u_r^2(V_1) + u_r^2(V_2) + u_r^2(c_0)} \\ &= \sqrt{(0.46\%)^2 + (0.15\%)^2 + (0.35\%)^2} \\ &= 0.60\% \end{aligned}$$

2.4 标准曲线绘制及样品测定 (此过程引入不确定度分量评估)

2.4.1 标准曲线绘制

取 0.5094 mg/ml 标准溶液分别 1.00、1.75、2.50、3.75、5.00、7.50 ml 于 25.0 ml 容量瓶中, 用纯水定容并上下颠倒混匀, 依据 GB/T5009.139—2003 提供的方法进行测定, 得到不同浓度标准溶液峰面积见表 1。

表 1 标准溶液的峰面积

标准浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	峰面积 A	回归计算值 \hat{A}
20.376	475.82	470.47
35.658	838.99	834.10
50.940	1195.28	1197.72
76.410	1809.03	1803.76
101.880	2381.61	2409.80
152.820	3636.99	3621.88

利用最小二乘法得到回归方程: $A = -14.36 + 23.79c_i$ 计算: $r = 0.9999$; $b = 23.79$; $a = -14.36$

$$\sum (A - \hat{A})^2 = 1109.37$$

假定可乐中咖啡因浓度的不确定度仅与峰面积测定的不确定度有关,而与校准标准溶液的不确定度无关,则峰面积的实验标准差为:

$$S_{(A_1)} = \sqrt{\frac{\sum (A - \hat{A})^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{1109.27}{6 - 2}} = 16.6536$$
$$\bar{c} = 73.014 \mu\text{g/ml}$$

$$\sum C = 438.084 \quad \sum C^2 = 4385.53$$
$$(\sum C)^2 = 191917.591$$

实际上,标准溶液配制及稀释过程中的不确定度与样品中咖啡因浓度的不确定度有关,在前文中已计算出: $u_i = \frac{u_{(c_i)}}{c_i} = 0.6\%$ 。在配制标准系列的浓度为 $152.82 \mu\text{g/ml}$ 溶液时引入的不确定度 $u_{(c_i)} = u_r(c_i) \times c_i = 0.9169 \mu\text{g/ml}$,转换为峰面积的不确定度 $u_{(A_2)} = 11.1212$

峰面积引入的不确定度

$$s_{(A)} = \sqrt{u^2(A_1) + u^2(A_2)} = 20.0256$$

截距引入的不确定度

$$u_{(a)} = s_A \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{\sum (c_i - \bar{c})^2}} = 13.0695$$

斜率引入的不确定度

$$u(c) = \sqrt{(0.042 \times 20.0256)^2 + (-0.042 \times 13.0695)^2 + (3.9612 \times 0.1529)^2} = 1.1 \mu\text{g/ml}$$

则其扩展不确定度为标准不确定度 $1.1 \mu\text{g/ml}$ 乘以包含因子 ($k=2$), 为 $U=2.2 \mu\text{g/ml}$ 。

2.6 样品测定

2.6.1 样品处理 将可乐饮料取出放入小烧杯中,在超声波清洗器上超声5 min取出,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,待上机。

2.6.2 将处理好的样品与标准溶液相同体积进样,测得峰面积如下,分别为 2199.60, 2246.80, 2266.80, 2250.30, 计算出峰面积的平均值为: $\bar{A} = 2240.88$

样品中咖啡因的含量:

$$c = \frac{\bar{A} - a}{b} = \frac{2240.88 - (-14.36)}{23.79} = 94.8 \mu\text{g/ml}$$

则检验值的表达为:测量值 \pm 扩展不确定度 (94.8 ± 2.2) $\mu\text{g/ml}$ 。

3 结论

通过本次不确定度的评定得到被测样品咖啡因的含量 $C = 94.8 \mu\text{g/ml}$,其正确表达方式为 ($94.8 \pm$

$$u_{(b)} = s_A \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})^2}} = 0.1529$$

2.4.2 灵敏系数

对 $A = a + bc$ 式中各量求偏导得到它们各自的灵敏系数如下:

$$\frac{\partial c}{\partial A} = \frac{1}{b} = 0.042$$

$$\frac{\partial c}{\partial a} = -\frac{1}{b} = -0.042$$

$$\frac{\partial c}{\partial b} = -\frac{A - a}{b^2} = 3.9612$$

标准不确定度和灵敏系数汇总见表2。

表2 标准不确定度和灵敏系数汇总

不确定度分量	量值	标准不确定度	灵敏系数
峰面积(A)	2240.88	20.0256	0.042
截距(a)	-14.36	13.0695	-0.042
斜率(b)	23.79	0.1529	3.961

2.5 被测量的标准不确定度的合成

根据测量不确定度传播定律,样品中咖啡因浓度(c)的不确定度主要来自峰面积(A)、截距(a)、斜率(b)的不确定度,按下列公式计算:

$$u^2(c) = \left[\frac{\partial c}{\partial A} u_A \right]^2 + \left[\frac{\partial c}{\partial a} u_a \right]^2 + \left[\frac{\partial c}{\partial b} u_b \right]^2$$

2.2) $\mu\text{g/ml}$ 。在本实验中,样品前处理比较简单,引入的不确定度分量同标准系列在同一体系中的相互抵消不必考虑,要考虑的是标准溶液的配制及标准系列的稀释过程中引入的不确定度分量。通过分析计算结果可知,选择精度高的容量器皿以及规范操作对测量结果的准确性也很重要。因不确定度的评定只与测定的方法有关,所以用相同的实验方法在相同条件下得到的结果都可以引用此次的评定结果。通过此次评定结果可知其测定结果的可靠程度达到了国标要求,找到了工作中的关键步骤,对提高测量结果的质量有指导意义。

参考文献

- [1] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南[M]. 北京:中国计量出版社, 2005:19-21.
- [2] 中国实验室国家认可委员会. 化学分析中不确定度评定与表示指南[M]. 北京:中国计量出版社, 2002:118-120.
- [3] 上海市食品卫生监督检验所,上海卫生检验检疫局. GB/T 5009.139—2003 饮料中的咖啡因的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2004.