

高效液相色谱法测定羊奶粉中维生素 A 和 E 含量的不确定度评定

李璐, 董文君, 张倩婷

(富平县检验检测中心/陕西省羊乳产品质量监督检验中心, 陕西富平 711799)

摘要: 为评定高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测定羊奶粉中维生素 A 和 E 含量的不确定度, 参考 GB 5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》, 分析测定过程中各种因素 (包括样品测量重复性、仪器分析、样品前处理、标准系列溶液配制和加标回收率) 引入的不确定度。当羊奶粉中维生素 A 和 E 的含量分别为 684.0 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ 和 11.51 $\text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ 时, 其扩展不确定度分别为 58.4 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ ($k=2$)、1.10 $\text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ ($k=2$)。主要来源于标准系列工作液配制和标准曲线拟合, 其次是标准中间液配制和标准储备液校正等。规范配制各级标准溶液, 使用检定合格的量器, 定期维护核查移液器和仪器, 以降低引入的不确定度, 从而有效控制检测质量。

关键词: 羊奶粉; 维生素 A; 维生素 E; 高效液相色谱; 不确定度

Uncertainty evaluation in determination of vitamin A and vitamin E in goat milk power by HPLC

LI Lu, DONG Wenjun, ZHANG Qianting

(Fuping County Inspection and Testing Center, Shaanxi Provincial Goat Milk Product Quality Supervision and Testing Center, Fuping 711799, Shaanxi)

Abstract: In order to evaluate the uncertainty of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the determination of vitamin A and vitamin E in goat milk powder, reference to GB 5009.82-2016, 'National Standard for Food Safety Determination of Vitamins A, D, and E in Foods', and the uncertainty introduced by the various factors in the determination process (including sample measurement repeatability, instrumental analysis, sample pretreatment, standard series solution preparation and spiking recovery). When the contents of vitamin A and vitamin E in goat milk powder were 684.0 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ and 11.51 $\text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$, the extended uncertainties were 58.4 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ ($k=2$) and 1.10 $\text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ ($k=2$), respectively. The main source is from the standard series working solution preparation and standard curve fitting, followed by the standard intermediate solution preparation and standard reserve solution calibration, etc. Standardized preparation of standard solutions at all levels, use certified measure, regular maintenance check pipette and instrument are required to reduce the uncertainty introduced and effectively control the quality of the test.

Keywords: goat milk power; Vitamin A; Vitamin E; HPLC; uncertainty

维生素 A 和维生素 E 属于脂溶性维生素, 维生素 A 具有参与视紫红质合成、维持上皮组织稳定和促进骨骼生长等作用^{[1][2]}, 维生素 E 具有保护大脑神经元、抗氧化、抗炎和促进生育等作用^{[3][4]}, 维生素 A 和 E 缺乏与多种疾病的产生联系密切, 过量摄入亦会对人体健康造成损害^{[5][6]}。GB10765-2021《食品安全国家标准 婴儿配方食品》^[7]中维生素 A 的指标范围为 14~36 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{kJ}$, GB10766-2021《食品安全国家标准 较大婴儿配方食品》^[8]和 GB10767-2021《食品安全国家标准 幼儿配方食品》^[9]中维生素 A 的指标范围为 18~43 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{kJ}$, GB14880-2012《食品安全国家标准 食品营养强化剂》^[10]中维生素 A 在儿童用

基金项目 陕西省重点研发计划项目 (2024GH-YBXM-16); 渭南市科技计划项目 (2022ZDYFJH-47)

作者简介 李璐 (1991-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为检验检测技术, E-mail: lilulife@qq.com

乳粉中的使用量为 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~7000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，孕产妇用乳粉中的使用量为 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，其它调制乳粉（儿童用乳粉和孕产妇用乳粉除外）中的使用量为 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~9000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；维生素 E 在婴儿配方食品中的指标范围为 0.12~1.20mg(α -TE)/100kJ^[7]，较大婴儿配方食品和幼儿配方食品的指标范围为 0.14~1.20mg(α -TE)/100kJ^{[8][9]}，在儿童用乳粉中的使用量为 10mg/kg~60mg/kg，孕产妇用乳粉中的使用量为 32mg/kg~156mg/kg，其它调制乳粉中的使用量为 100mg/kg~310mg/kg^[10]。羊奶是世界上第三大奶源，被称为“奶中之王”^[11]，与母乳最为相似，易消化且生物利用率高^[12]，脂肪含量高于牛奶且多为短链脂肪酸^[13]，羊奶以其特殊的营养结构和功能价值越来越受到消费者的青睐。本地羊奶年产量约 23 万吨，绝大部分制作成了各类羊奶粉，迫于对羊奶粉质量控制和监督管理的需要，准确检测羊奶粉中的维生素 A 和 E 的含量显得尤为重要。

测量不确定度能够定量表征测量结果的质量和分散程度^[14]，因此表示为测量结果与其不确定度的方式更加准确可信。通过不确定度评定充分反映实验过程中的各种影响因素，便于技术人员分析实验过程中的主要误差来源，采取纠正措施规范操作行为和步骤。维生素 A 和 E 常用的检测方法有紫外可见分光光度法^[15]、高效液相色谱（紫外/荧光）法^{[16][17]}、高效液相色谱-串联质谱法^[18]和气相色谱法^[15]，GB5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》^[19]首推高效液相色谱法测定食品中的维生素 A 和 E，本文依据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[20]和 CNAS-GL06: 2019《化学分析中不确定度的评估指南》^[21]，应用高效液相色谱法对羊奶粉中维生素 A 和 E 含量的不确定度进行分析和评定，以明确各不确定度来源对结果的影响程度，为控制检测过程中的关键环节提供依据，保证检测结果数据的可靠性。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Vanquish Core 高效液相色谱仪（配二极管阵列检测器）：美国赛默飞世尔科技公司。Cary 4000 紫外可见分光光度计：美国安捷伦科技公司。BT125D 十万分之一电子分析天平：德国赛多利斯科学仪器有限公司。PTY-223/323 千分之一电子分析天平：华志（福建）电子科技有限公司。SHA-C 恒温水浴振荡器：北京科伟永兴仪器有限公司。JW-B 分液漏斗（垂直）振荡器：常州市顶新实验仪器有限公司。高速离心机：德国 CMVC 公司。数控超声波清洗器：昆山市超声仪器有限公司。UPHW-IV-90T 超纯水机：四川优普超纯科技有限公司。移液器（100 μL ~1000 μL 、20 μL ~200 μL 、25 μL ~250 μL 和 5 μL ~50 μL ）：大龙兴创实验仪器（北京）股份公司。5mL、10mL 棕色容量瓶（A 级）：天玻玻璃仪器有限公司。

视黄醇标准品（CAS 号 68-26-8，纯度 99.3%，100mg/瓶）， α -生育酚标准品（CAS 号 10191-41-0，纯度 97.5%，100mg/瓶）， β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚标准品（CAS 号分别为 148-03-8、54-28-4、119-13-1，纯度分别为 99.3%、99.3%、99.2%，50mg/瓶）：坛墨质检科技股份有限公司。甲醇、乙醇、正己烷为色谱纯：德国默克公司。氢氧化钾、抗坏血酸为分析纯：天津市科密欧化学试剂有限公司。羊奶粉：市售。

1.2 仪器工作条件

色谱柱：Shim-pack Velox PFP 柱[150mm \times 4.6mm，5 μm ：岛津（上海）实验器材有限公司]，流动相：甲醇（A）和水（B），A:B=9:1 等度洗脱 25min^[16]，流速：0.8mL/min，柱温：20 $^{\circ}\text{C}$ ，进样体积：10 μL ，紫外检测波长：维生素 A 为 325 nm，维生素 E 为 294 nm。标准品的色谱图见图 1（图中视黄醇、 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚标准品浓度分别为 4.906 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、28.091 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、28.900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、27.455 和

25.522 $\mu\text{g/mL}$)。

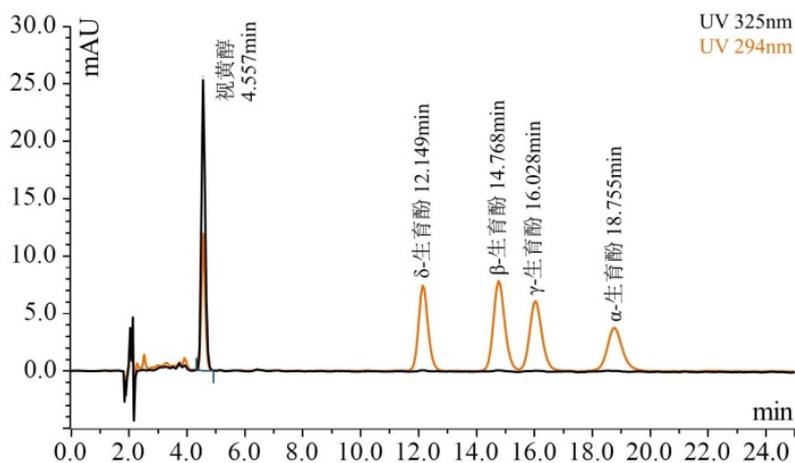


图1 维生素A和E的色谱图

1.3 实验步骤

1.3.1 样品前处理

参考 GB 5009.82-2016 第三法皂化和提取,操作过程全程避光。称取 1g(精确至 0.001g)羊奶粉于 50mL 具塞离心管中,加入 0.4g 抗坏血酸和 6mL 约 40°C 温水,涡旋混匀 1min。再加入 12mL 乙醇,涡旋混匀 30s, 6mL 氢氧化钾溶液(氢氧化钾:水=1:1,质量比),充分摇匀后放入恒温振荡器中,80°C 避光恒温水浴振荡 30min,取出放入冷水中降至室温。加入 20mL 正己烷,放在垂直振荡器上 300 次/min 振荡提取 3min, 20°C 6000r/min 离心 3min,取上清液至另一 50mL 离心管,加入 25mL 水,上下颠倒晃动 6 次,20°C 6000r/min 离心 3min,取上清液至玻璃试管,40°C 氮气吹干,重复提取 3 次合并至同一玻璃试管吹干。加入 5mL 甲醇复溶,超声 1min,涡旋混匀 30s,过 0.22 μm 有机系滤膜供仪器测定。同时做空白和加标样品,结果以扣除空白值计算。

1.3.2 标准溶液配制

参考 GB 5009.82-2016 第一法配制维生素 A 和 E 标准溶液。用乙醇分别配制浓度约为 0.5mg/mL 和 1mg/mL 的维生素 A 和维生素 E 标准储备液。

分别吸取维生素 A 和维生素 E 标准储备液 0.2mL 和 0.5mL 于同一 10mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度配制混合标准中间液。

吸取混合标准中间液 0.05mL、0.1mL、0.25mL、0.5mL、1mL、2mL、3mL 于 5mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度配制标准系列工作液。

在临用前按照附录 B 方法校正标准储备液浓度,分别取维生素 A 标准储备液 0.05mL、维生素 E 标准储备液 0.5mL 于各 10mL 棕色容量瓶中,用乙醇定容至刻度配制维生素标准稀释液。根据维生素标准稀释液浓度计算标准储备液浓度。

1.3.3 样品测定

将样品待测液和标准系列工作液按照仪器工作条件上机(1.2)测定。用保留时间定性,外标法定量,标准系列工作液以目标化合物峰面积(Y)为纵坐标,以质量浓度(X)为横坐标,绘制线性标准曲线。

2 数学模型

样品中维生素 A 和 E 的含量按式(1)计算： $x=X \times V \times f / m$ (1)

式中： x ——试样中目标化合物的含量，维生素 A 单位 $\mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ （以视黄醇当量计），维生素 E 单位 $\text{mg}/100\text{g}$ ；

X ——提取液中目标化合物的质量浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

m ——试样质量，g；

V ——定容体积， mL ；

f ——换算因子，维生素 A 为 100，维生素 E 为 0.1。

总维生素 E = α -生育酚 + β -生育酚 $\times 0.5$ + γ -生育酚 $\times 0.1$ + δ -生育酚 $\times 0.01$ ，单位 $\text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ （以 α -生育酚当量计）。

3 测量不确定度来源

按照 JJF1135-2005《化学分析测量不确定度评定》^[22]分析检测过程，不确定度主要来源有：（1）样品测量重复性引入的不确定度；（2）仪器分析引入的不确定度；（3）样品前处理引入的不确定度；（4）混合标准系列溶液配制引入的不确定度；（5）加标回收率引入的不确定度。

4 不确定度评定

4.1 样品测量重复性引入的相对不确定度 $u_r(R_{\text{样}})$

按样品前处理方法对 6 份羊奶粉进行检测，根据 JJF1135-2005 中贝塞尔公式计算重复性（见表 1）。假设为均匀分布（ $k=\sqrt{3}$ ），则 $u_r(R_{\text{样}}) = \frac{S}{\bar{x} \times \sqrt{n} \times k}$ 。即 $u_r(R_{\text{样-视黄醇}}) = 3.30 / (684.0 \times \sqrt{6} \times \sqrt{3}) = 0.00114$ ，同理 $u_r(R_{\text{样-}\alpha\text{-生育酚}}) = 0.00155$ ， $u_r(R_{\text{样-}\beta\text{-生育酚}}) = 0.00273$ ， $u_r(R_{\text{样-}\gamma\text{-生育酚}}) = 0.000852$ ， $u_r(R_{\text{样-}\delta\text{-生育酚}}) = 0.00373$ 。维生素 A 的含量 $\bar{x}_{\text{维生素 A}} = \bar{x}_{\text{视黄醇}} = 684.0 \mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ ，总维生素 E 的含量 $\bar{x}_{\text{维生素 E}} = \bar{x}_{\alpha\text{-生育酚}} + \bar{x}_{\beta\text{-生育酚}} \times 0.5 + \bar{x}_{\gamma\text{-生育酚}} \times 0.1 + \bar{x}_{\delta\text{-生育酚}} \times 0.01 = 10.60 + 0.7601 \times 0.5 + 5.152 \times 0.1 + 1.372 \times 0.01 = 11.51 \text{ mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ 。

表 1 样品重复性测量数据 ($n=6$)

项目	1	2	3	4	5	6	平均值 \bar{x}	标准偏差 S
称样量 m/g	1.001	1.002	1.003	1.005	1.003	1.004	1.003	0.00141
视黄醇质量浓度 $X/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	1.371	1.37	1.376	1.362	1.378	1.375	1.372	0.00576
视黄醇含量 $x/(\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1})$	684.8	683.6	685.9	677.6	686.9	684.8	684.0	3.30
α -生育酚质量 浓度 $X/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	21.306	21.456	21.278	21.21	21.29	21.098	21.273	0.118
α -生育酚含量 $x/(\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1})$	10.64	10.71	10.61	10.55	10.61	10.51	10.60	0.0695
β -生育酚质量 浓度 $X/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	1.504	1.524	1.514	1.524	1.558	1.524	1.525	0.0182
β -生育酚含量 $x/(\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1})$	0.7512	0.7605	0.7547	0.7582	0.7767	0.7590	0.7601	0.00879

γ-生育酚质量 浓度 $X/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	10.298	10.374	10.376	10.348	10.294	10.316	10.334	0.0368
γ-生育酚含量 $x/(\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1})$	5.144	5.177	5.172	5.148	5.132	5.137	5.152	0.0186
δ-生育酚质量 浓度 $X/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	2.826	2.706	2.76	2.754	2.752	2.72	2.753	0.0417
δ-生育酚含量 $x/(\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1})$	1.412	1.350	1.376	1.370	1.372	1.355	1.372	0.0217

4.2 仪器分析引入的相对不确定度 $u_r(I)$

高效液相色谱仪经检定，由证书可知其测量重复性 $S = 0.1\%$ ，假设为均匀分布 ($k=\sqrt{3}$)，则其相对不确定度 $u_r(I) = S/k = 0.001/\sqrt{3} = 0.000577$ 。

4.3 样品前处理引入的相对不确定度

4.3.1 样品称量引入的相对不确定度 $u_r(W_{\text{样}})$

天平校准证书显示其最大允许误差 $M = \pm 0.5 \text{ mg}$ ，羊奶粉称量的平均值为 $\bar{m} = 1.003\text{g}$ (见表 1)，假设为均匀分布 ($k=\sqrt{3}$)，则 $u_r(W_{\text{样}}) = \frac{M}{\bar{m} \times k} = 0.0005/(1.003 \times \sqrt{3}) = 0.000288$ 。

4.3.2 复溶定容引入的相对不确定度 $u_r(V_{\text{样}})$

主要由量器的容量允差 $u_r(V_{\text{容}})$ 和环境温度波动 $u_r(V_{\text{温}})$ 引入。

按照 JJF1135-2005，移液器假设为均匀分布 ($k=\sqrt{3}$)，玻璃量器服从三角分布 ($k=\sqrt{6}$)。查询 JJG646-2006《移液器检定规程》^[23] 和 JJG196-2006《常用玻璃量器》^[24]，得到量器的容量允许误差 (见表 2)，由计算公式得出量器引入的相对不确定度 (见表 2)，从表 2 可知 5mL 的单标线吸量管的相对不确定度 $u_r(V_{\text{容-管-5mL}}) = 0.00122$ 。

实验室温度 25°C，量器校准时温度 20°C。已知甲醇的体积膨胀系数^[25] (见表 3)，假设为均匀分布 ($k=\sqrt{3}$)，由计算公式得出环境温度波动引入的相对不确定度 (见表 3)，即 $u_r(V_{\text{温-甲醇}}) = 0.00341$ 。

合并得 $u_r(V_{\text{样}}) = [u_r^2(V_{\text{容}}) + u_r^2(V_{\text{温}})]^{1/2} = (0.00122^2 + 0.00341^2)^{1/2} = 0.00362$ 。

表 2 移液器和玻璃量器引入的相对不确定度

类别	标称容量/mL	使用体积 V/mL	容量允许误差 M	计算公式	$u_r(V_{\text{容}})$
移液器	0.05	0.05	±3.0%	$u_r(V_{\text{容}}) = \frac{M}{k}$ ($k=\sqrt{3}$)	0.0173
	0.2	0.1	±2.0%		0.0115
	0.2	0.2	±1.5%		0.00866
	0.25	0.25	±1.5%		0.00866
	1	0.5	±1.0%		0.00577
	1	1	±1.0%		0.00577
单标线吸量管	5	5	±0.015mL	$u_r(V_{\text{容}}) = \frac{M}{V \times k}$	0.00122
容量瓶	5	5	±0.020mL	$(k=\sqrt{6})$	0.00163
	10	10	±0.020mL		0.000816

表3 环境温度波动引入的相对不确定度

类别	温度差 $\Delta T/^\circ\text{C}$	体积膨胀系数 $\alpha/^\circ\text{C}$	计算公式	$u_r(V_{\text{温}})$
甲醇	5	0.00118	$u_r(V_{\text{温}}) = \frac{\alpha \times \Delta T}{k}$ ($k=\sqrt{3}$)	0.00341
乙醇		0.00109		0.00315

4.4 标准系列溶液配制引入的相对不确定度

4.4.1 标准储备液校正引入的相对不确定度 $u_r(C_{\text{储}})$

不确定度主要由标准稀释液配制 $u_r(C_D)$ 、仪器 $u_r(C_I)$ 和重复性 $u_r(C_R)$ 引入。

从表2可知移液器和容量瓶使用体积引入的相对不确定度 $u_r(C_{D-\text{容}-0.05\text{mL}}) = 0.0173$ 、 $u_r(C_{D-\text{容}-0.5\text{mL}}) = 0.00577$ 、 $u_r(C_{D-\text{容}-10\text{mL}}) = 0.000816$ 。已知乙醇的体积膨胀系数^[26]（见表3），假设为均匀分布（ $k=\sqrt{3}$ ），从表3可知环境温度波动引入的相对不确定度 $u_r(V_{D-\text{温}-\text{乙醇}}) = 0.00315$ 。由标准稀释液配制过程（见1.3.2）可知各量器的使用次数。则 $u_r(C_{D-\text{视黄醇}}) = [u_r^2(C_{D-\text{容}-0.05\text{mL}}) + u_r^2(C_{D-\text{容}-10\text{mL}}) + u_r^2(C_{D-\text{温}-\text{乙醇}}) \times 2]^{1/2} = (0.0173^2 + 0.000816^2 + 0.00315^2 \times 2)^{1/2} = 0.0179$ ； $u_r(C_{D-\alpha-\text{生育酚}}) = u_r(C_{D-\beta-\text{生育酚}}) = u_r(C_{D-\gamma-\text{生育酚}}) = u_r(C_{D-\delta-\text{生育酚}}) = [u_r^2(C_{D-\text{容}-0.5\text{mL}}) + u_r^2(C_{D-\text{容}-10\text{mL}}) + u_r^2(C_{D-\text{温}-\text{乙醇}}) \times 2]^{1/2} = (0.00577^2 + 0.000816^2 + 0.00315^2 \times 2)^{1/2} = 0.00734$ 。

根据紫外可见分光光度计的检定证书可知其透射比的最大允许误差 $M=\pm 0.1\%$ ，假设为均匀分布（ $k=\sqrt{3}$ ），则其相对不确定度 $u_r(C_I) = M/k = 0.001/\sqrt{3} = 0.000577$ 。

标准储备液质量浓度测定结果见表4。由贝塞尔公式计算重复性，假设为均匀分布（ $k=\sqrt{3}$ ），则 $u_r(C_R) = \frac{s}{\bar{x} \times \sqrt{n} \times k}$ （见表4）。

合并得 $u_r(C_{\text{储}-\text{视黄醇}}) = [u_r^2(C_{D-\text{视黄醇}}) + u_r^2(C_{I-\text{视黄醇}}) + u_r^2(C_{R-\text{视黄醇}})]^{1/2} = (0.0179^2 + 0.000577^2 + 0.00000494^2)^{1/2} = 0.0179$ ；同理， $u_r(C_{\text{储}-\alpha-\text{生育酚}}) = 0.00736$ ， $u_r(C_{\text{储}-\beta-\text{生育酚}}) = 0.00737$ ， $u_r(C_{\text{储}-\gamma-\text{生育酚}}) = 0.00737$ ， $u_r(C_{\text{储}-\delta-\text{生育酚}}) = 0.00737$ 。

表4 标准储备液校正重复性测量数据（ $n=6$ ）

化合物	标准储备液浓度/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)						平均值 \bar{x}	标准偏差 S	$u_r(C_R)$
	1	2	3	4	5	6			
视黄醇	0.613210	0.613221	0.613199	0.613210	0.613232	0.613199	0.613212	0.0000129	0.00000494
α -生育酚	1.40234	1.40476	1.40500	1.40497	1.40503	1.40526	1.40456	0.00110	0.000185
β -生育酚	1.44593	1.44616	1.44629	1.44369	1.44391	1.44404	1.44500	0.00124	0.000202
γ -生育酚	1.37374	1.37393	1.37391	1.37176	1.37174	1.37149	1.37276	0.00121	0.000208
δ -生育酚	1.27706	1.27766	1.27655	1.27503	1.27540	1.27487	1.27610	0.00116	0.000214

4.4.2 混合标准中间液配制引入的相对不确定度 $u_r(C_{\text{中}})$

不确定度主要由量器的容量允差 $u_r(C_{\text{中-容}})$ 和环境温度波动 $u_r(C_{\text{中-温}})$ 引入。从表2可知移液器和容量瓶使用体积引入的相对不确定度，从表3可知环境温度波动引入的相对不确定度，由混合标准中间液配制过程（见1.3.2）可知各量器的使用次数，则 $u_r(C_{\text{中}-\text{视黄醇}}) = [u_r^2(C_{\text{中-容}-0.2\text{mL}}) + u_r^2(C_{\text{中-容}-10\text{mL}}) + u_r^2(C_{\text{中-温}-\text{甲醇}}) + u_r^2(C_{\text{中-温}-\text{乙醇}})]^{1/2} = (0.00866^2 + 0.000816^2 + 0.00341^2 + 0.00315^2)^{1/2} = 0.00986$ ； $u_r(C_{\text{中}-\alpha-\text{生育酚}}) = u_r(C_{\text{中}-\beta-\text{生育酚}}) = u_r(C_{\text{中}-\gamma-\text{生育酚}}) = u_r(C_{\text{中}-\delta-\text{生育酚}}) = [u_r^2(C_{\text{中-容}-0.5\text{mL}}) + u_r^2(C_{\text{中-容}-10\text{mL}}) + u_r^2(C_{\text{中-温}-\text{甲醇}}) + u_r^2(C_{\text{中-温}-\text{乙醇}})]^{1/2} = (0.00577^2 + 0.000816^2 + 0.00341^2 + 0.00315^2)^{1/2} = 0.00745$ 。

4.4.3 混合标准系列工作液配制引入的相对不确定度 $u_r(C_{\text{工}})$

主要由量器的容量允差 $u_r(C_{\text{工-容}})$ 和环境温度波动 $u_r(C_{\text{工-温}})$ 引入。从表2可知移液器和容量瓶使用体积

引入的相对不确定度，从表 3 可知环境温度波动引入的相对不确定度（忽略溶剂中的乙醇）。由标准系列工作液配制过程（见 1.3.2）可知使用 5 μ L~50 μ L、20 μ L~200 μ L 和 25 μ L~250 μ L 移液器各 1 次，100 μ L~1000 μ L 移液器 7 次，5mL 容量瓶 7 次。则 $u_r(C_{\text{工-视黄醇}}) = u_r(C_{\text{工-}\alpha\text{-生育酚}}) = u_r(C_{\text{工-}\beta\text{-生育酚}}) = u_r(C_{\text{工-}\gamma\text{-生育酚}}) = u_r(C_{\text{工-}\delta\text{-生育酚}}) = [u_r^2(C_{\text{工-容-0.05mL}}) + u_r^2(C_{\text{工-容-0.1mL}}) + u_r^2(C_{\text{工-容-0.25mL}}) + u_r^2(C_{\text{工-容-0.5mL}}) + u_r^2(C_{\text{工-容-1mL}}) \times 6 + u_r^2(C_{\text{工-容-5mL}}) \times 7 + u_r^2(C_{\text{工-温-甲醇}}) \times 17]^{1/2} = (0.0173^2 + 0.0115^2 + 0.00866^2 + 0.00577^2 + 0.00577^2 \times 6 + 0.00163^2 \times 7 + 0.00341^2 \times 17)^{1/2} = 0.0309$ 。

4.4.4 标准曲线拟合引入的相对不确定度 $u_r(C_{\text{拟}})$

7 个浓度的标准系列工作液平行测定 2 次，利用仪器工作软件制作标准曲线，标准曲线线性方程见表 5，通过标准曲线计算样品待测液中目标化合物浓度。

$$\text{根据公式}^{[27]}: S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - Y_f)^2}{n-2}} \quad (2)$$

$$u(C_{\text{拟}}) = \frac{S}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{X} - \bar{X}_0)^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}_0)^2}} \quad (3)$$

$$u_r(C_{\text{拟}}) = u(C_{\text{拟}}) / \bar{X} \quad (4)$$

式中： S 为标准系列工作液峰面积的标准偏差； b 为标准曲线的斜率； p 为样品平行测定的次数， $p=6$ ； n 为标准系列工作液测定的个数， $n=2 \times 7=14$ ； \bar{X} 为样品溶液的平均质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ； \bar{X}_0 为标准系列工作液的平均质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ 。计算结果见表 6。

表 5 维生素 A 和 E 线性回归方程及相关系数

化合物	标准曲线各点质量浓度 $X_i/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	峰面积平均值 $Y_i/(\text{mAU}\cdot\text{min})$	拟合峰面积 $Y_f/(\text{mAU}\cdot\text{min})$	线性方程 $Y=bX+a$
视黄醇	0.123	0.1667	0.0841	$Y=1.0264X$ -0.0418 $r = 0.9992$
	0.245	0.2674	0.2100	
	0.613	0.5772	0.5876	
	1.226	1.1576	1.2170	
	2.453	2.4127	2.4758	
	4.906	4.8861	4.9934	
	7.359	7.6106	7.5110	
α -生育酚	0.702	0.1168	0.0016	$Y=0.1824X$ -0.1265 $r = 0.9990$
	1.405	0.1803	0.1297	
	3.511	0.4694	0.5140	
	7.023	1.1221	1.1545	
	14.046	2.3544	2.4354	
	28.091	4.8810	4.9973	
	42.137	7.6723	7.5593	
β -生育酚	0.723	0.1489	0.0661	$Y=0.2552X$ -0.1183 $r = 0.9997$
	1.445	0.3206	0.2505	
	3.613	0.6971	0.8036	
	7.225	1.7115	1.7255	
	14.450	3.5164	3.5693	
	28.900	7.2446	7.2570	
	43.350	10.9787	10.9446	
γ -生育酚	0.686	0.1346	0.0916	$Y=0.2287X$ -0.0654 $r = 0.9998$
	1.373	0.2719	0.2486	
	3.432	0.6124	0.7195	
	6.864	1.5404	1.5044	
	13.728	3.0720	3.0741	

	27.455	6.2282	6.2136	
	41.183	9.3460	9.3531	
	0.638	0.1334	0.0848	
	1.276	0.2773	0.2263	
	3.190	0.5598	0.6509	$Y=0.2218X$
δ -生育酚	6.380	1.3569	1.3585	-0.0567
	12.761	2.7485	2.7737	$r = 0.9998$
	25.522	5.6212	5.6041	
	38.283	8.4387	8.4344	

表 6 标准曲线拟合引入的不确定度

化合物	S	b	$\bar{X}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\bar{X}_0/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}_0)^2$	$u(C_{\text{拟}})/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$u_r(C_{\text{拟}})$
视黄醇	0.05714	1.0264	1.372	2.418	45.265	0.02851	0.0208
α -生育酚	0.06568	0.1824	21.273	13.845	1484.2	0.1889	0.00888
β -生育酚	0.04781	0.2552	1.525	14.244	1570.9	0.1094	0.0717
γ -生育酚	0.03586	0.2287	10.334	13.532	1417.8	0.07766	0.00752
δ -生育酚	0.03441	0.2218	2.753	12.579	1225.2	0.08732	0.0317

4.5 加标回收率引入的相对不确定度 $u_r(R_{\text{回}})$

对羊奶粉样品做 6 个平行加标 ($n=6$)，分别加维生素 A 标准储备液 0.01mL，维生素 E 标准储备液 0.025mL。经样品前处理，测定得到维生素 A 和 E 的加标回收率（见表 7），满足 GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》^[28]4.1.5.1 对正确度的要求，即回收率符合在 80%~110%范围的要求。

$$\text{计算公式}^{[29]}: S(R) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}{n-1}} \quad (5)$$

$$u_r(R_{\text{回}}) = \frac{S(R)}{\bar{R} \times \sqrt{n}} \quad (6)$$

用 t 检验对回收率进行显著性检验， $t_{\text{视黄醇}} = |1 - \bar{R}|/S(R) = |1 - 100.8\%|/6.753\% = 0.122$ ，同理 $t_{\alpha\text{-生育酚}} = 0.191$ ， $t_{\beta\text{-生育酚}} = 0.851$ ， $t_{\gamma\text{-生育酚}} = 0.304$ ， $t_{\delta\text{-生育酚}} = 0.360$ 。取 $P=0.95$ ，查 t 检验表知 $t_{(0.05)} = 2.57$ ，所以维生素 A 和 E 的 t 值均小于 $t_{(0.05)}$ ，即 \bar{R} 与 1 无显著性差异，无需考虑加标回收率引入的不确定度。

表 7 样品回收率测定数据

化合物	回收率 $R/\%$						平均值 \bar{R}	标准差 $S(R)/\%$	$u_r(R_{\text{回}})$
	1	2	3	4	5	6			
视黄醇	104.7	102.4	108.5	104.3	91.9	93.1	100.8	6.753	0.0273
α -生育酚	97.8	92.8	103.6	102.5	103.1	105.7	100.9	4.771	0.0193
β -生育酚	104.1	98.8	100.6	100.5	103.2	104.2	101.9	2.219	0.00889
γ -生育酚	102.0	106.6	92.4	98.6	107.7	102.9	101.7	5.615	0.0225
δ -生育酚	106.8	102.6	90.1	92.4	97.8	96.8	97.8	6.209	0.0259

4.6 合成不确定度 $u_c(Y)$

如果不考虑各分量之间的相关性，则维生素 A 合成不确定度 $u_c(Y_{\text{维生素 A}}) = u_c(Y_{\text{视黄醇}}) = [u_r^2(R_{\text{样}}) + u_r^2(I) + u_r^2(W_{\text{样}}) + u_r^2(V_{\text{样}}) + u_r^2(C_{\text{储}}) + u_r^2(C_{\text{中}}) + u_r^2(C_{\text{工}}) + u_r^2(C_{\text{拟}})]^{1/2} = (0.00114^2 + 0.000577^2 + 0.000288^2 + 0.00362^2 + 0.0179^2 + 0.00986^2 + 0.0309^2 + 0.0208^2)^{1/2} = 0.0427$ 。同理，维生素 E 的合成不确定度 $u_c(Y_{\alpha\text{-生育酚}}) = 0.0340$ ， $u_c(Y_{\beta\text{-生育酚}}) =$

0.0789, $u_c(Y_{\gamma\text{-生育酚}}) = 0.0337$, $u_c(Y_{\delta\text{-生育酚}}) = 0.0458$ (见表 8)。

维生素 A 和维生素 E 的相对不确定度分量如图 2 所示。其中 β -生育酚和 δ -生育酚的标准曲线拟合对其测定结果的不确定度贡献最大，尤其是 β -生育酚的远高于其它分量，可能是因为样品待测液中 β -生育酚和 δ -生育酚的浓度没有落在标准曲线的中间处。其次是标准系列工作液配制，而后是标准中间液配制和标准储备液校正，实际工作中可以根据待检样品数量或节约标准品成本等情况下，适当增大标准溶液配制时的吸取用量和选用较大规格的容量瓶。

因为维生素 E 的测量过程完全一致，要大均大或要小均小，按照 JJF1059.1-2012 的原则属于完全正相关，所以采用加权代数和的方式来计算合成不确定度。即总维生素 E 的合成不确定度 $u_c(Y_{\text{维生素 E}}) = [u_r(Y_{\alpha\text{-生育酚}}) + u_r(Y_{\beta\text{-生育酚}}) \times 0.5 + u_r(Y_{\gamma\text{-生育酚}}) \times 0.1 + u_r(Y_{\delta\text{-生育酚}}) \times 0.01] / (1 + 0.5 + 0.1 + 0.01) = (0.0340 + 0.0789 \times 0.5 + 0.0337 \times 0.1 + 0.0458 \times 0.01) / (1 + 0.5 + 0.1 + 0.01) = 0.0480$ 。根据以往工作中大量积累的市售样品检测数据显示羊奶粉常含有 α -生育酚和 γ -生育酚，偶尔含有 δ -生育酚，很少含有 β -生育酚，婴幼儿配方羊奶粉和调制羊奶粉以 α -生育酚为主作为营养物质添加使用^[30]，可以根据实际样品所包含的生育酚种类进行总维生素 E 不确定度的加权代数和合成。

表 8 相对不确定度分量汇总表

不确定度来源	各分量	相对不确定度				
		视黄醇	α -生育酚	β -生育酚	γ -生育酚	δ -生育酚
样品测量重复性	$u_r(R_{\text{样}})$	0.00114	0.00155	0.00273	0.000852	0.00373
仪器分析	$u_r(I)$	0.000577	0.000577	0.000577	0.000577	0.000577
样品称量	$u_r(W_{\text{样}})$	0.000288	0.000288	0.000288	0.000288	0.000288
复溶定容	$u_r(V_{\text{样}})$	0.00362	0.00362	0.00362	0.00362	0.00362
标准储备液校正	$u_r(C_{\text{储}})$	0.0179	0.00736	0.00737	0.00737	0.00737
标准中间液配制	$u_r(C_{\text{中}})$	0.00986	0.00745	0.00745	0.00745	0.00745
标准系列工作液配制	$u_r(C_{\text{工}})$	0.0309	0.0309	0.0309	0.0309	0.0309
标准曲线拟合	$u_r(C_{\text{拟}})$	0.0208	0.00888	0.0717	0.00752	0.0317
合成不确定度	$u_c(Y)$	0.0427	0.0340	0.0789	0.0337	0.0458

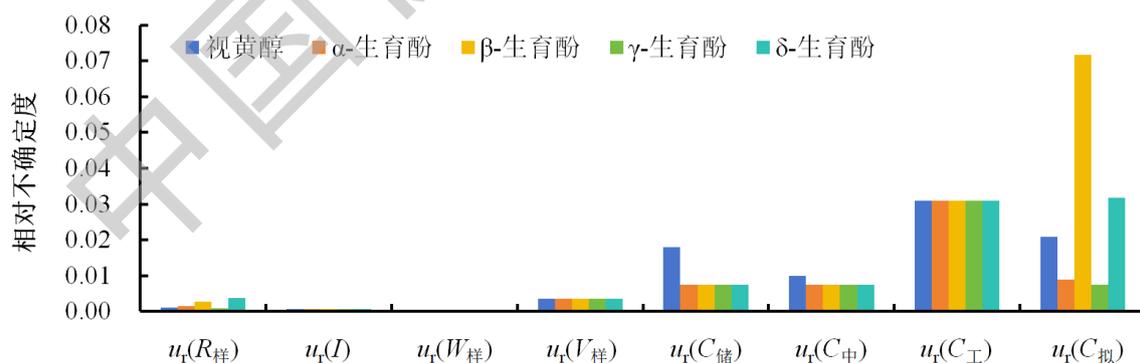


图 2 维生素 A 和 E 的相对不确定度分量柱状图

4.7 扩展不确定度 U 及结果表示

依据 JJF1059.1-2012，取包含因子 $k=2$ (95%置信度)，则扩展不确定度 $U_{\text{维生素 A}} = u_c(Y_{\text{维生素 A}}) \times k \times \bar{x}_{\text{维生素 A}} = 0.0427 \times 2 \times 684.0 = 58.4 \mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$; $U_{\text{维生素 E}} = u_c(Y_{\text{维生素 E}}) \times k \times \bar{x}_{\text{维生素 E}} = 0.0480 \times 2 \times 11.51 = 1.10 \text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ 。因此，该羊奶粉中维生素 A 和 E 的含量分别为 $(684.0 \pm 58.4) \mu\text{g}(\text{RE})/100\text{g}$ 和 $(11.51 \pm 1.10) \text{mg}(\alpha\text{-TE})/100\text{g}$ 。

5 结语

通过高效液相色谱法测定羊奶粉中维生素 A 和 E 的含量,采用相对不确定度分量逐步合成的方式分析与评定,因而得出不确定度主要来源于标准系列工作液配制和标准曲线拟合,其次是标准中间液配制和标准储备液校正等。因此在检测过程中:(1)应规范配制各级标准溶液,使用检定合格的量器,尽量选择示值误差小、量程适宜的量器;(2)实验室温度尽可能接近量器校准时的温度,一般控制在 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$,能将温度波动造成的影响降到最小;(3)通过调整标准中间液、标准系列工作液浓度或分段拟合标准曲线等方式,使样品待测液中目标化合物浓度落在标准曲线中间;(4)定期维护核查移液器和仪器,使其保持灵敏准确;(5)注重强化检测人员实验操作的规范和熟练,提高专业技术水平。以降低引入的不确定度,从而有效控制检测质量。本文可为羊奶粉或其他食品中维生素 A 和 E 含量的测定以及类似检测项目不确定度评定提供参考。

参考文献:

- [1] 周艳华,李涛,卢岚,等. RP/NP-HPLC 法检测婴幼儿配方食品中维生素 A 和维生素 E 研究[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35 (06): 185-192.
- [2] 孙爱琦,李倩. 维生素 A 与临床相关疾病的研究进展[J]. 锦州医科大学学报, 2024, 45 (02): 108-112.
- [3] Galli F, Azzi A, Birringer M, et al. Vitamin E: emerging aspects and new directions[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 102: 16-36.
- [4] Kuchan M J, Jensen S K, Johnson E J, et al. The naturally occurring α -tocopherol stereoisomer RRR- α -tocopherol is predominant in the human infant brain[J]. The British Journal of Nutrition, 2016, 116 (1): 126-131.
- [5] Napoli, Joseph L. Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2017, 173: 19-33.
- [6] 陈建行,贾晓江,刘建光,等. 我国婴儿配方奶粉脂溶性维生素的科学设计范围研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21 (12): 181-193.
- [7] 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. GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴儿配方食品[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- [8] 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. GB 10766-2021 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- [9] 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. GB 10767-2021 食品安全国家标准 幼儿配方食品[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 14880-2012 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准[S], 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [11] 潘琪浩,仁青措姆,高腾云,等. 羊奶的营养价值、生物学功能及应用[J]. 动物营养学报, 2023, 35 (12): 7584-7594.
- [12] 梅芷晴,马浩睿,刘永峰,等. 羊乳母乳化及主要活性成分研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2024, 47(4): 38-46.
- [13] 娄新曼. 奶山羊乳脂肪的组成及其稳定性研究[D]. 齐鲁工业大学, 2016: 5-6.

- [14] 翟洪稳, 范素芳, 王娟, 等. 测量不确定度在食品检验中的应用及进展[J]. 食品科学, 2021, 42 (5): 314-320.
- [15] 吴景, 邢书霞, 曹进. 食品中维生素检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6 (08): 2881-2889.
- [16] 王璐, 蒲华寅, 邹力, 等. 高效液相色谱法同时测定植物油中 3 种维生素 A 和 9 种维生素 E[J]. 粮食与油脂, 2023, 36 (09): 150-158.
- [17] 冯寅洁, 黄银波, 周小清, 等. 超高效液相色谱-大体积流通池荧光法检测配方乳粉中维生素 A 及维生素 E[J]. 中国乳品工业, 2023, 51 (11): 52-57.
- [18] 朱姜, 张鹏, 杨嘉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中的维生素 A、维生素 D、维生素 E[J]. 中国卫生检验杂志, 2015 (11): 1733-1739.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.82-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 2013.
- [21] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL06: 2019 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [22] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S]. 北京: 中国计量出版社, 2005.
- [23] 国家质量监督检验检疫总局. JJG646-2006 移液器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. JJG196-2006 常用玻璃量器[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [25] 肖璇, 周凌聿, 陈春泉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 5 种卡因类麻醉剂及其代谢物的不确定度[J]. 化学分析计量, 2024, 33 (3): 121-128.
- [26] 刘小燕, 张建林, 倪琳, 等. 高效液相色谱法测定心脑血管胶囊中芍药苷的不确定度评定[J]. 化学分析计量, 2024, 33 (4): 115-125.
- [27] 孙钰朋, 杜福映, 郭利娟, 等. 高效液相色谱法测定药物涂层球囊中紫杉醇含量的不确定度评定[J]. 化学分析计量, 2022, 31 (8): 72-76.
- [28] 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. GB 5009.295-2023 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
- [29] 韩璿烜, 罗芸, 王传兴, 等. HPLC-MS/MS 测定新疆驼乳粉中氯酸盐与高氯酸盐含量的不确定度评定[J]. 中国乳品工业, 2023, 51 (04): 52-58.
- [30] 荣玉珊, 刘爱国. 乳粉强化剂添加量初探[J]. 食品科学, 2001, (02): 97-98.