

高效液相色谱法测定食醋中乳酸的不确定度评定

惠燕¹, 宗莹莹¹, 何学英¹, 朱瑞强², 杨秀培^{1*}

(1. 西华师范大学化学化工学院, 南充 637000; 2. 南充市产品质量监督检验所, 南充 637000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定食醋中乳酸的不确定度的数学模型。**方法** 根据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》, 从测量过程各步骤分析不确定度来源, 并对已识别来源的不确定度影响进行评价和分析。**结果** 测量结果不确定度主要来源于乳酸标准溶液、试样溶液配制和液相色谱仪的定量重复性。当食醋中乳酸含量为 48.49 mg/g 时, 其扩展不确定度为 1.34 mg ($k=2$)。**结论** 该研究可为实验室评定食醋中乳酸含量的测定结果质量提供参考。

关键词: 食醋; 乳酸; 高效液相色谱; 不确定度

Uncertainty evaluation for determining concentration of lactic acid in vinegar by high performance liquid chromatography

HUI Yan¹, ZONG Ying-Ying¹, HE Xue-Ying¹, ZHU Rui-Qiang², YANG Xiu-Pei^{1*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, China West Normal University, Nanchong 637000, China;
2. Nanchong Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Nanchong 637000, China)

ABSTRACT: Objective A mathematical model was established to assess the uncertainty for detection the concentration of lactic acid in vinegar by high performance liquid chromatography. **Methods** According to JJF1059.1-2012, various sources of uncertainty from the detection procedure were assessed. The effects of the identified uncertainty on the analytic result were evaluated. **Results** The impacts of major source of measurement uncertainty were lactic acid solution, sample solution and the quantitative repeatability of HPLC. When the content of lactic acid in vinegar was 48.49 mg/g, the expanded uncertainty reached 1.34 mg ($k=2$). **Conclusion** The study can provide a reference for evaluating quality of lactic acid content in vinegar.

KEY WORDS: vinegar; lactic acid; high performance liquid chromatography; uncertainty

1 引言

随着现代微生物技术的发展, 乳酸菌已被广泛应用于食品行业^[1], 如乳制品、果蔬制品生产及酿造工业中。传统的酿造调味品是我国饮食文化的重要内

容, 食醋、酱油、乳制品等都是人们在日常生活中经常食用的酿造调味品, 它们不仅能够调味, 还具有保健作用, 其特有的风味是由多种微生物经过较长时间作用形成的。乳酸菌是发酵过程中常见的微生物, 乳酸菌的发酵产物主要是乳酸, 对产品的品质和风

基金项目: 四川省大学生创新创业训练计划项目(201310638044); 国家自然科学基金面上项目(21277109)

Fund: Supported by the Student Training Programs for Innovation and Entrepreneurship in Sichuan Province (201310638044) and the National Natural Science Foundation of China (21277109).

*通讯作者: 杨秀培, 教授, 主要研究方向为食品及药物分析。E-mail: xiupeiyang@163.com

*Corresponding author: YANG Xiu-Pei, Professor, College of Chemistry and Chemical Engineering, China West Normal University, Nanchong 637000, China. E-mail: xiupeiyang@163.com

味起着重要作用。食醋是我国传统的酿造食品之一, 可是, 我国现行食醋行业中对如何区别酿造食醋及配制食醋并没有明确的标准。由于乳酸是酿造食醋中的重要呈味物质之一, 是在发酵过程中产生的, 然而配制食醋却不能经过这种作用产生乳酸, 因此, 准确测定食醋中的乳酸含量对辨别酿造食醋和配制食醋具有重要意义。

自 20 世纪 80 年代以来, 食品安全备受人们关注, 食品生产企业及质量监督部门对食品的检测也越来越广泛, 在检测中进行不确定度评定是判定测定结果的一个重要依据^[2,3]。本文主要探讨利用高效液相色谱法测定食醋中乳酸结果的不确定度评定, 我们根据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》的要求^[4], 科学地对测量结果的不确定度进行了分析, 为食醋中乳酸测定结果提供了科学、公正、可溯源的数据。

2 实验方法

2.1 仪器和试剂

Waters e2695 型高效液相色谱仪(配有 2996 型光电二极管矩阵检测器及 Empower 色谱数据处理系统), 美国 Waters 公司; pHs-3C 型酸度计; CAV214C 型电子天平。

亚铁氰化钾、磷酸为分析纯(成都化学试剂厂), 硫酸锌为分析纯(广东西陇化工厂), 磷酸二氢钠为分析纯(天津市致远化学试剂)有限公司; 乳酸标准品(德国), 实验用水为超纯水。

2.2 色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 值为 2.8), 使用前经 0.45 μm 滤膜过滤; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 23 °C; 检测波长: 210 nm。

准确吸取一定量的乳酸标准品 45.7 μL, 配成 1.0 mL 乳酸标准储备液, 准确吸取一定量的上述溶液, 用超纯水稀释成 10 mg/mL。并用 0.45 μm 滤膜过滤后, 上机测定乳酸标准溶液的出峰面积。

2.3 样品预处理

食醋样品处理参照文献进行^[5], 取 10 mL 食醋样品于 100 mL 容量瓶中, 分别加入 2 mL 亚铁氰化钾(质量分数为 10.6%)和 2 mL 硫酸锌(质量分数为 30%)溶液, 摇匀后用超纯水定容, 静置沉淀 30 min, 移取

上清液, 进样分析。

3 数学模型的建立

样品中乳酸浓度计算公式为:

$$X = \frac{A \times C_0 \times V}{A_0 \times m} \quad (1)$$

式中, X 为样品中乳酸含量(mg/g); C_0 为乳酸标准使用液浓度(mg/mL); A 为样品稀释液色谱图中乳酸峰面积; A_0 为乳酸标准溶液色谱图中峰面积; V 为试样稀释后总体积(mL); m 为样品质量(g)。

分析测定结果的不确定度除以上参数的影响之外, 试样的均匀性和预处理的一致性对检验结果也会产生一定程度的影响, 因此, 公式(1)中需引入修正因子 f_{rep} , 转变为下数学模型:

$$X = \frac{A \times C_0 \times V}{A_0 \times m} \times f_{rep} \quad (2)$$

该模型显示, 各参数之间相互独立, 且各自的不确定度分别影响被测参数 X 的不确定度, 灵敏系数为 1。采用相对标准不确定度可以合成标准不确定度 u_{Crel} , 依据 JJF1059.1-2012, u_{Crel} 可表示为:

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

因此, 被测量 X 的标准不确定度可表示为:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}^2(C_0) + u_{rel}^2(A_0) + u_{rel}^2(A) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(f_{rep})} \quad (4)$$

4 分量的不确定度来源与分析

4.1 不确定度的来源

从测定过程和相关数学模型看, 试样中乳酸含量的不确定度主要来源于标准试剂, 样品预处理的差异, 色谱峰面积的测定, 各来源又分别由不同因素决定^[6,7], 我们将不确定度来源主要归纳为以下几点: (1)配制乳酸标准溶液产生的不确定度, 包括标准试剂纯度、标准溶液配制所用量器和标准物质配制温度波动等因素产生的不确定度。(2)标准溶液和样品溶液色谱峰面积测量的不确定度, 包括色谱峰面积重复测量和仪器数据处理过程产生的不确定度。(3)称样量 m 引入的不确定度。(4)样品预处理后稀释到体积 V 引入的不确定度, 包括容量瓶校准和温度变化产生的不确定度。(5)样品均匀性和预处理过程 f_{rep}

产生的不确定度

4.2 标准不确定度分量的评定

4.2.1 配制乳酸标准溶液产生的不确定度

(1) 标准物质引入产生的不确定度

标准试剂乳酸的不确定度为 1%，一般，给出标准物质的扩展不确定度^[8]，属正态分布，置信度 $P=99\%$ ，包含因子 $k=3$ ，其相对不确定度：

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

(2) 标准溶液配制量器引入的不确定度

标准溶液配制使用的 1 mL 吸量管、10 mL 容量瓶均属 A 级，参照《常用玻璃量具检定规程 JJG196-1990》^[9]的规定，有相应的最大允许误差，依据矩形分布， $k = \sqrt{3}$ ，计算所得不确定度分量见表 1。

由表 1 数据合成的相对标准不确定度：

$$u_{2rel} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 5.77 \times 10^{-3}$$

(3) 标准溶液配制时温度波动产生的不确定度

实验室温度通常在 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间波动，通过估算温度范围和体积膨胀系数来估算其引入的不确定度。显然，液体的体积膨胀大于玻璃的体积膨胀，故只考虑前者。水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ ，假设温度变化是矩形分布，计算所得不确定度分量见表 2。

由表 2 数据合成的相对标准不确定度：

$$u_{3rel} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 8.63 \times 10^{-4}$$

(4) 标准溶液配制产生的不确定度合成

标准溶液 C_0 的相对标准不确定度可由标准试剂、量器校准和温度波动的标准不确定度分量合成如下：

$$u_{rel}(C_0) = \sqrt{u_{1rel}^2 + u_{2rel}^2 + u_{3rel}^2} = 6.72 \times 10^{-3}$$

4.2.2 标准溶液色谱峰面积测量的不确定度评定

(1) 标准溶液乳酸色谱峰面积重复测量引起的不确定度

重复进样分析，包含了进样量的不确定度，根据 JJF1059.1-2012，采用极差法估算，由表 3 色谱峰面积数据计算($n=7$)，极差系数 $C=2.70$ 。

测量结果的平均值为 2046910，极差 $R=(2056223-2041725)=14508$ ，标准不确定度 $u_{A0}=S(A_0)=R/C=14508/2.70=5373.33$ ，相对标准不确定度 $u_{1rel}=u_{A0}/A_0=5373.33/2046910=2.62 \times 10^{-3}$ 。

(2) 仪器数据记录及处理系统引起的不确定度

目前，液相色谱仪峰面积的自动积分处理误差通常在为 0.2%~1%，取最大误差 1%，其相对不确定度为：

$$u_{2rel} = \frac{U}{k} = \frac{1\%}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}$$

(3) 标准溶液峰面积测量的不确定度合成

乳酸标准溶液色谱峰面积测量的相对标准不确定度可根据 u_{1rel} 和 u_{2rel} 合成如下：

$$u_{rel}(A_0) = \sqrt{u_{1rel}^2 + u_{2rel}^2} = 6.34 \times 10^{-3}$$

4.2.3 样品溶液色谱峰面积的不确定度评定

(1) 色谱峰面积重复测量产生的不确定度

表 4 为样品溶液乳酸色谱峰面积数据计算，与标准溶液评定方法类似，测量结果的平均值为 1010403.9，极差 $R=(1020897.3-1001528.2)=19369.1$ ，标准不确定度 $u_A=S(A)=R/C=19369.1/2.70=7173.74$ ，相对标准不确定度 $u_{1rel}=u_A/A=15855.89/361179.0=7.10 \times 10^{-3}$ 。

表 1 标准溶液配制过程中量器引起的不确定度

Table 1 Uncertainty arouse from errors of volumetric flask and pipets used in preparation of standard solutions

玻璃量器	最大允差 (mL)	标准不确定度	相对标准不确定度
10 mL 容量瓶 A 级	± 0.02	0.0346	$u_1=3.46 \times 10^{-3}$
1 mL 吸量管 A 级	± 0.008	0.00462	$u_2=4.62 \times 10^{-3}$

表 2 温度波动产生的不确定度

Table 2 Ncertainty arouse from effect of fluctuation in temperature

玻璃量器	计算公式	标准不确定度	相对标准不确定度
10 mL 容量瓶	$10 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.00606	$u_1=6.1 \times 10^{-4}$
1 mL 吸量管	$1 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.000303	$u_2=6.1 \times 10^{-4}$

表 3 标准溶液重复进样测定结果
Table 3 Data of repeat detection in standard solution

进样次数	1	2	3	4	5	6	7
峰面积 A_0	2043308	2042635	2041725	2042783	2047366	2056223	2054322

表 4 样品重复进样测定结果
Table 4 Data of repeat detection in sample

进样次数	1	2	3	4	5	6	7
峰面积 A	1001528.2	1007453.3	1008296.6	1009219.3	1014459.2	1010973.1	1020897.3

(2) 所用仪器数据处理引起的不确定度。
目前, 用于液相色谱仪峰面积积分处理的误差在 0.2%~1%范围, 取最大值 1%, 峰面积对应的相对不确定度为:

$$u_{2rel} = \frac{U}{k} = \frac{1\%}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}$$

(3) 样品溶液峰面积测量的不确定度合成
样品溶液色谱图中乳酸峰面积测量的相对标准不确定度可由 u_{1rel} 和 u_{2rel} 合成如下:

$$u_{rel}(A) = \sqrt{u_{1rel}^2 + u_{2rel}^2} = 9.15 \times 10^{-3}$$

4.2.4 样品称重质量 m 引入的不确定度
样品称量为 10.500 g, 天平所给出的质量允许差 $\Delta y = 1.0$ mg, 置信度 $P = 99\%$, 属正态分布^[10], 包含因子 $k = 3$ 。

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

$$u_{rel}(m) = \frac{u_2}{m} = \frac{3.33 \times 10^{-4}}{10.500} = 3.17 \times 10^{-5}$$

4.2.5 样品预处理后的溶液总体积 V 的标准不确定度
(1) 容量瓶校准的不确定度

样品预处理后以 100 mL 的容量瓶(A 级)定容, 根据《常用玻璃量具检定规程 JJG196-1990》, 其最大允许误差 $\Delta y = \pm 0.10$ mL, 按矩形分布估算, $k = \sqrt{3}$ 。则标准不确定度: $u_1 = \Delta y / k = 0.10 / \sqrt{3} = 0.05774$, 相对标准不确定度: $u_{1rel} = 0.05774 / 100 = 5.77 \times 10^{-4}$ 。

(2) 温度波动引入的不确定度

容量瓶校正时的温度和溶液温度不同, 温差为 5 ℃, 水的膨胀系数是 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 假如温度波动属矩形分布, 则标准不确定度估算为: $u_2 = \frac{V \times \Delta T \times 2.1 \times 10^{-4}}{k}$
 $= \frac{100 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.06062 \text{ mL}$, 相对标准不确定

度: $u_{2rel} = u_2 / V = 0.06062 / 100 = 6.06 \times 10^{-4}$ 。
(3) 样品预处理后溶液的总体积 V 的标准不确定度合成

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{1rel}^2 + u_{2rel}^2} = 8.37 \times 10^{-4}$$

4.2.6 样品均匀性和预处理过程 f_{rep} 引入的不确定度评定

分析结果的重现性一般与检测人员的样品预处理过程的一致性、样品的均匀性和仪器自身的性能有关, 采用同一食醋样品重复测定乳酸含量, 结果见表 5。

测量结果的平均值 $\bar{X} = 48.49$ mg/g
单次测量结果的标准偏差:

$$s_X = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.540$$

标准不确定度: $u_2 = \frac{s_X}{\sqrt{n}} = 0.220$

相对标准不确定度: $u_{rel}(f_{rel}) = \frac{u_2}{\bar{X}} = 4.53 \times 10^{-3}$

5 不确定度的合成与扩展

5.1 标准不确定度各分量的汇总

5.2 合成标准不确定度评定

合成标准不确定度由表 6 所列各相对标准不确定度合成如下:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}(C_0)^2 + u_{rel}(A_0)^2 + u_{rel}(A)^2 + u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(V)^2 + u_{rel}(f_{rep})^2}$$
$$= \sqrt{(6.72 \times 10^{-3})^2 + (6.34 \times 10^{-3})^2 + (9.15 \times 10^{-3})^2 + (3.17 \times 10^{-5})^2 + (8.37 \times 10^{-4})^2 + (4.53 \times 10^{-3})^2}$$

5.3 扩展不确定度评定

合成标准不确定度乘以包含因子即得扩展不确

表 5 重复检测结果
Table 5 The results of the repeated determinations

进样次数	1	2	3	4	5	6
峰面积 A	1051560.0	1041474.6	1050921.9	1021718.2	1050501.6	1036492.3
测量结果 X/(mg/g)	48.93	48.46	48.90	47.54	48.88	48.23

表 6 不确定度分量汇总表
Table 6 Summary table of uncertainty components

分量名称	相对标准不 确定度合成	不确定度来源分析		相对标准不 确定度分量
$u_{\text{rel}}(C_0)$	6.72×10^{-3}	标准溶液准备的不确定度	标准试剂纯度产生的不确定度 标准溶液配制量器的不确定度 标准溶液配制温度波动的不确定度	3.33×10^{-3} 5.77×10^{-3} 8.63×10^{-4}
$u_{\text{rel}}(A_0)$	6.34×10^{-3}	标准溶液色谱峰面积测量的不确定度	色谱峰面积重复测量的不确定度 仪器数据处理的不确定度	2.62×10^{-3} 5.77×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(A)$	9.15×10^{-3}	试样溶液色谱峰面积测量的不确定度	色谱峰面积重复测量的不确定度 仪器数据处理的不确定度	7.10×10^{-3} 5.77×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(m)$	3.17×10^{-5}	样品称重质量 m 引起的不确定度		3.17×10^{-5}
$u_{\text{rel}}(V)$	8.37×10^{-4}	样品体积 V 的不确定度	容量瓶校准的不确定度 温度变化产生的不确定度	5.77×10^{-4} 6.06×10^{-4}
$u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}})$	4.53×10^{-3}	试样均匀性和处理操作过程的一致性		4.53×10^{-3}

定度, 根据《测量不确定度表示指南》^[11], 置信度 $P=95\%$ 时, $k=2$, 因此, 食醋中乳酸含量测定的相对扩展不确定度为:

$$U = u_{\text{rel}}(X) \times k = 0.014 \times 2 = 0.028$$

由实验数据计算得到食醋中乳酸的最佳估计值为 $C_X=48.49 \text{ mg/g}$, 故其扩展不确定度为: $U=48.49 \text{ mg/g} \times 0.028=1.34 \text{ mg/g}$ 。

6 测量不确定度报告与表示

食醋中乳酸测量结果为:

$$C_X=(48.49 \pm 1.34) \text{ mg/g}, k=2。$$

7 结 论

通过对测量过程中产生的不确定度进行量化, 说明用高效液相色谱法测定食醋样品中乳酸含量的过程中, 不确定度主要来源于乳酸标准溶液试样溶液配制过程, 峰面积测量, 试样配制与处理, 试样称重等过程。对于乳酸测量结果影响较大的不确定度分量包括样品溶液色谱峰面积测量、样品均匀性和预处理过程的一致性, 以及乳酸标准溶液配制与峰面积

测量产生的不确定度, 试样处理总体积产生的不确定度也相对较大, 而样品称重和温度变化产生的不确定度相对较小。因此, 在用液相色谱法测定食醋中乳酸含量的过程中, 应该尽量避免或减小各种因素带来的影响, 以减小测量结果的不确定度, 从而进一步提高检测数据的可靠性和一致性。

参考文献

[1] 王夫杰, 鲁绯, 纪凤娣, 等. 乳酸菌在中国传统酿造调味品中的应用[J]. 中国调味品, 2009, 34(9): 24–25.
Wang FJ, Lu F, Ji FD, et al. Application of lactobacillus in chinese traditional brewing condiment [J]. China Condiment, 2009, 34(9): 24–25.

[2] 杨秀培, 肖丹, 山桂云, 等. 白酒中己酸乙酯测定的不确定度评估[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 214–218.
Yang XP, Xiao D, Shang GY, et al. The evaluation of uncertainty in determination of ethyl caproate in Chinese spirits [J]. Food Sci, 2006, 27(7): 214–217 .

[3] 陈俊, 黄琼, 万红梅, 等. 高效液相色谱法测定白酒中安赛蜜、糖精钠的不确定度分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(4): 179–182.
Chen J, Huang Q, Wan HM, et al. Determination of acesulfame

- potassium and saccharin sodium in white spirit analysis of uncertainty by HPLC [J]. Food Safe Qual Detection Technol, 2011, 2(4): 179–182.
- [4] JJF1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. JJF1059.1-2012 Guide to the expression of uncertainty in measurement [S].
- [5] 王伟岗, 曹伟, 朱新生. 食醋中有机酸含量的测定及差异性分析[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(2): 81–84.
Wang WG, Cao W, Zhu XS. Determination of organic acids in vinegar and difference analysis [J]. Sichuan Food Ferment, 2013, 49(2): 81–84.
- [6] 张新乔. 白酒中己酸乙酯测定的不确定度评定[J]. 酿酒科技, 2011, 209(9): 103–106.
Zhang XQ. Evaluation of uncertainty in the determination of ethyl caproate in liquor [J]. Liquor-making Sci Technol, 2011, 209(9): 103–106.
- [7] 赵婷. 酱卤肉制品中菌落总数测量结果不确定度评定[J]. 计量与测试技术, 2010, 37(1): 55–56.
Zhao T. Uncertainty of evaluation measurement of aerobic plate count in cookedm products [J]. Metrol Meas Technique, 2010, 37(1): 55–56.
- [8] 张素娟. 气相色谱法测定白酒中乙酸乙酯含量的不确定度分析[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 151–153.
Zhang SJ. Uncertainty analysis of GC determination of ethyl acetate in distilled spirit [J]. Food Sci, 2010, 31(2): 151–153.
- [9] JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [10] 蔡秋, 朱明. 高效液相色谱法测定茶饮料中苯甲酸结果不确定度评定[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 277–280.
Cai Q, Zhu M. Uncertainty evaluation for determining concentration of benzioc acid in tea drink by HPLC [J]. Food Sci, 2007, 28(2): 277–280.
- [11] ISO/IEC.GUM 98-3 Guide to the expression of uncertainty in measurement [S].

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



惠 燕, 理学学士, 主要研究方向为应用化学。
E-mail: 523301371@qq.com



杨秀培, 教授, 博士, 主要研究方向为食品及药物分析。
E-mail: hnndjlw@163.com