

高效液相色谱法测定 Fapas 能力验证样品中 咖啡因含量的不确定度评定

李彬*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 评定高效液相色谱法测定 Fapas 能力验证项目中咖啡因含量的不确定度。**方法** 依据国家计量技术规范 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》对研磨咖啡粉(Sample A)和去咖啡因研磨咖啡粉(Sample B)2个样品中咖啡因含量测定的不确定度来源进行分析。通过建立数学模型量化不确定度分量, 计算合成不确定度和扩展不确定度, 并与 Fapas 能力验证结果进行对比。**结果** Sample A 结果报告为(13.36±0.21) g/kg, $k=2$; Sample B 结果报告为(265.0±5.1) mg/kg, $k=2$, 且 Fapas 能力验证结果为满意; 2个样品咖啡因含量测量不确定度均主要来源于标准曲线配制过程、样品重复性和标准曲线拟合3部分。**结论** 该研究可为评价咖啡因含量测定结果的质量和实验室内部质量提供参考; 同时不确定度评定和能力验证结果表明实验室在不同的浓度水平上均有能力开展相关检测并能保证数据可靠。

关键词: 不确定度; 咖啡因; Fapas; 高效液相色谱法

Uncertainty evaluation of determination of caffeine in Fapas proficiency testing samples by high performance liquid chromatography

LI Bin*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of caffeine in Fapas proficiency testing (PT)samples using high performance liquid chromatography. **Methods** The sources of uncertainty in caffeine determination in both ground coffee (Sample A) and decaffeinate ground coffee (Sample B) samples were analyzed according to the national measurement technical specification JJF 1059.21-2012 *Evaluation and expression of uncertainty in measurement*. The combined uncertainty and extended uncertainty were calculated by establishing mathematical model, and the results were compared with Fapas PT report. **Results** The result report of Sample A was (13.36±0.21) g/kg, $k=2$, while Sample B was (265.0±5.1) mg/kg, $k=2$. Both results were satisfactory according to PT report. And both of the main uncertainty sources were from the standard solution preparation, the repeatability of sample measurement, and the fitting of the standard curve. **Conclusion** The results provide references to evaluate the quality of caffeine determination and control lab internal quality. Uncertainty evaluation and PT results show that the laboratory is capable of carrying out relevant tests at different concentration levels and can guarantee the reliability of data.

KEY WORDS: uncertainty; caffeine; Fapas; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 李彬, 工程师, 主要研究方向为食品化妆品理化检测及质量标准提高。E-mail: libin@nifdc.org.cn

*Corresponding author: LI Bin, Engineer, National Institutes for Food and Drug Control, No 2, Tiantan Xili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: libin@nifdc.org.cn

1 引言

测量不确定度是与测量结果相关联的一个参数,用以表征被测量之值的分散性及其质量^[1]。能力验证是对实验室能力状况和管理状况进行客观考核的一种方法,可以判定实验室能力^[2]。英国 Fapas 分析实验室能力验证是专门从事食品检测分析方面的能力评估体系,通过实验室间测试结果的比对来判定实验室能力的合格评定活动^[3]。

咖啡因是一种从咖啡果、茶叶中提取出来的黄嘌呤生物碱化合物,适度摄入可以兴奋神经,因此含咖啡因的饮料十分畅销^[4]。英国 Fapas 机构于 2019 年组织 Fapas 03151 国际能力验证项目,设置研磨咖啡粉和去咖啡因研磨咖啡粉 2 个样品,以考察实验室对不同浓度水平咖啡因含量的测定能力。本文根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[5],并参考 CNAS-GL006《化学分析中不确定度的评估指南》^[6]等,评定实验室使用 GB 5009.139-2014《食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定》^[7]测定 Fapas 能力验证样品中咖啡因含量的不确定度,分析实验过程中不确定度的来源,量化各分量,为进一步提高检测数据质量提供依据。同时结合 Fapas 能力验证报告^[8]有关数据,对检测结果进行综合分析,更加全面地评价检测结果可信度和实验室检测能力。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2695 型高效液相色谱仪(带有二极管阵列检测器,美国 Waters 公司); ZORBAX Eclipse C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); AL204 电子天平($d=0.0001$ g)、XP205 电子天平($d=0.00001$ g)(瑞士 Mettler Toledo 公司); 计量检定合格的移液器和 A 级玻璃量器; ZWF-110X30 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)。

咖啡因标准品: 纯度 99.9%, 购自中国食品药品检定研究院。

甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 实验室用水为 Sartorius 超纯水; Fapas 03151 项目能力验证样品: 研磨咖啡粉(Sample A)和去咖啡因研磨咖啡粉(Sample B)。

2.2 实验方法

采用 GB 5009.139-2014《食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定》^[7]方法对样品中的咖啡因含量进行检测。

2.2.1 标准曲线配制

精确称取标准物质约 100 mg 转移至 50 mL 容量瓶并用甲醇溶解定容, 配制标准物质储备液; 用 5 mL 移液器吸取储备液至 50 mL 容量瓶用水定容成标准物质中间液。

Sample A 使用标准曲线配制: 用 10 mL 移液器移取适量标准物质储备液至 200 mL 容量瓶加水定容。Sample B

使用标准曲线配制: 用 5 mL 移液器移取适量标准物质中间液至 200 mL 容量瓶加水定容。

2.2.2 样品处理

称取均匀样品约 1 g 于 250 mL 锥形瓶中, 加入约 200 mL 水(Sample A)或 70 mL 水(Sample B), 沸水浴 30 min, 不时振摇, 取出锥形瓶, 冷却至室温, 转移至 250 mL 或 100 mL 容量瓶加水定容, 摇匀, 静置, 取上清液经滤膜过滤, 备用。

2.3 数学模型

样品中咖啡因含量的计算表达式为:

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m} \quad (1)$$

式中: ω -样品中咖啡因含量, μg/g;

ρ -样品溶液中测得的咖啡因的浓度, μg/mL;

V -样品定容体积, mL;

m -样品的称样量, g。

2.4 环境条件

温度为(20±4) °C, 相对湿度≤75%。

3 结果与分析

3.1 测量不确定度的来源

由式(1)分析测量不确定度的主要来源有^[9]:

标准系列溶液引入的不确定度 $u(\text{标})$: 包括标准物质纯度引入的不确定度 $u(\text{标}_p)$; 标准物质称量引入的不确定度 $u(\text{标}_m)$; 标准曲线配制过程引入的不确定度 $u(\text{标}_v)$; 标准曲线拟合引入的不确定度 $u(\text{标}_\rho)$ 。

被测样品均匀性和处理过程一致性引入的不确定度 $u(\text{样})$: 包括样品称量引入的不确定度 $u(\text{样}_m)$; 样品定容引入的不确定度 $u(\text{样}_v)$; 重复性引入的标准不确定度 $u(\text{样}_\omega)$ 。

测量时液相色谱仪引入的不确定度 $u(\text{仪})$ 。

测量模型中输入量估计值相互独立, 采用相对标准不确定度合成公式计算: $u_{\text{rel}}^2(\omega) = \sum_{i=1}^n u_{\text{rel}}^2(x_i)$, 即

$$u_{\text{rel}}(\omega) = \sqrt{\begin{matrix} u_{\text{rel}}^2(\text{标}_p) + u_{\text{rel}}^2(\text{标}_m) + u_{\text{rel}}^2(\text{标}_v) \\ + u_{\text{rel}}^2(\text{标}_\rho) + u_{\text{rel}}^2(\text{样}_m) + u_{\text{rel}}^2(\text{样}_v) \\ + u_{\text{rel}}^2(\text{样}_\omega) + u_{\text{rel}}^2(\text{仪}) \end{matrix}} \quad (2)$$

3.2 测量不确定度分量的量化

3.2.1 标准系列溶液引入的相对标准不确定度($u_{\text{rel}}(\text{标})$)

(1) 标准物质纯度引入的相对标准不确定度($u_{\text{rel}}(\text{标}_p)$)

从标准物质证书上查得咖啡因标准物质的纯度为 99.9%, 未给出扩展不确定度, 假定其分布区间为±0.1%, 其区间半宽度为 0.1%, 按均匀分布计算^[10], 其纯度引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{标}_p) = \frac{0.1\%}{99.9\% \times \sqrt{3}} = 5.78 \times 10^{-4}$ 。

(2) 标准物质称量引入的相对标准不确定度($u_{\text{rel}}(\text{标}_m)$)

标准物质称量采用精度 $d=0.00001$ g 的电子天平, 电子天平铭牌标识 $e=10d$ 即 $e=0.1$ mg。其称量的测量不确定度分量应包括天平最大示值误差 $u(\text{标}_{m1})$ 、重复性 $u(\text{标}_{m2})$ 、分辨力 $u(\text{标}_{m3})$ 、偏载 $u(\text{标}_{m4})$ 等的影响。根据电子天平计量检定证书结果, 对其各分量的标准不确定度按均匀分布进行计算。

在 5 g 量程范围内, 天平示值误差为 $-0.2e$ 即 -0.02 mg, 则其区间半宽度为 0.02 mg, $u(\text{标}_{m1}) = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 1.15 \times 10^{-2}$ mg。天平的重复性误差为 $0.1e$ 即 0.01 mg, 则其区间半宽度为 0.005 mg, $u(\text{标}_{m2}) = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-3}$ mg。天平分辨力为 0.01 mg, 则其区间半宽度为 0.005 mg, $u(\text{标}_{m3}) = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-3}$ mg。天平仪器偏载误差为 $-0.9e$ 即 -0.09 mg, 则其区间半宽度为 0.09 mg, $u(\text{标}_{m4}) = \frac{0.09}{\sqrt{3}} = 5.20 \times 10^{-2}$ mg。

需注意的是, 根据 JJG 1036-2008《电子天平》^[11] 检定规程, 天平的示值误差和偏载误差均为天平读数即示值与试验载荷之差, 有正负值, 因此其区间半宽度为示值误差或偏载误差的绝对值。

此外, 环境温度、大气浮力和重力加速度可忽略不计。由于称量标准物质采用减量法, 存在 2 次称重, 因此以上 4 项合成标准不确定度为: $u(\text{标}_m) = \sqrt{2 \times (0.0115^2 + 0.00289^2 + 0.00289^2 + 0.0520^2)} = 7.55 \times 10^{-2}$ mg。

称取咖啡因标准物质 111.75 mg, 则标准物质称量引入的相对合成标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{标}_m) = \frac{0.0755}{111.75} = 6.76 \times 10^{-4}$ 。

(3) 标准曲线配制过程引入的相对标准不确定度 ($u_{\text{rel}}(\text{标}_v)$)

标准曲线配制过程引入的不确定度与量具和液体的体积相关, 该过程使用计量检定合格的容量瓶和移液器, 其不确定度主要由容量允许误差和环境温度引入, 标准曲线配制过程中量具使用的次数如表 1 所示。

根据 JJG 646-2006《移液器》^[12] 检定规程, 10 mL 移液器在检定点为 1 、 5 、 10 mL 时容量允许误差分别为 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 和 $\pm 0.6\%$, 使用容量分别为 3 、 4 、 5 、 6 和 7 mL, 容量允许误差均按 $\pm 0.6\%$ 计算, 即 ± 0.018 、 ± 0.024 、 ± 0.030 、 ± 0.036 和 ± 0.042 mL。

5 mL 移液器在检定点为 0.5 、 2.5 和 5 mL 时容量允许误差分别为 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 和 $\pm 0.6\%$, 使用容量分别为 0.5 、 1 、 2 、 3 和 4 mL, 容量允许误差分别按 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 和 $\pm 0.6\%$ 计算, 即 ± 0.005 、 ± 0.01 、 ± 0.01 、 ± 0.015 和 ± 0.024 mL。

根据 JJG 646-2006《移液器》^[10] 和 JJG 196-2006《常用玻璃量器》^[11] 检定规程规定的最大允许误差, 按照公式

(3) 计算由容量允许误差引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}})$ 。已知实验室温度为 (20 ± 4) °C, 量具在 20 °C 校准, 温度波动为 8 °C, 查得甲醇和水^[13] 体积膨胀系数分别为 1.19×10^{-3} 和 2.07×10^{-4} 。按照公式(4)计算环境温度引起的相对标准不确定度。

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}}) = \frac{a}{k \times V} \quad (3)$$

式中: a -量具校准引起的体积偏差(容量允许误差);

$k \cdot \sqrt{3}$ (按均匀分布计算);

V -标准溶液的体积, mL。

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}}) = \frac{a}{2 \times k \times V} \quad (4)$$

式中: a -温度波动引起的体积偏差, 等于温度波动 \times 体积膨胀系数 \times 使用体积;

$k \cdot \sqrt{3}$ (按均匀分布计算);

V -标准溶液的体积, mL。

根据各分量(见表 1)合成标准曲线配制过程引入的相对标准不确定度, $u_{\text{rel}}(\text{标}_{v-A}) = 8.42 \times 10^{-3}$;

$u_{\text{rel}}(\text{标}_{v-B}) = 1.12 \times 10^{-2}$ 。

(4) 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 ($u_{\text{rel}}(\text{标}_\rho)$)

实验采用最小二乘法对峰面积 A -浓度 ρ 进行线性拟合。由标准曲线拟合引入的标准不确定度 u_ρ 按公式(5)计算:

$$u_\rho = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\rho_0 - \bar{\rho})^2}{S_{xx}}} \quad (5)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (B_0 + B_1 \rho_i)]^2}{n-2}} \quad (6)$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\rho_i - \bar{\rho})^2 \quad (7)$$

式中: S -残差标准偏差; A_i -第 i 次标准溶液峰面积响应值; B_0 -截距; B_1 -斜率; p -试样平行测定次数; n -测定工作曲线的标准点数 ($n=10$); ρ_0 -被测样品溶液中咖啡因的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; $\bar{\rho}$ -工作曲线各点质量浓度的平均值, $\mu\text{g/mL}$; S_{xx} -工作曲线质量浓度差的平方和, $(\mu\text{g/mL})^2$ 。

本方法对 5 个不同浓度的咖啡因标准溶液进行了测定, 每个浓度测定 2 次, 计算结果见表 2。样品检验结果均为独立 2 次测量得均值, 由标准曲线校准计算得到 Sample A 咖啡因质量浓度为 $\rho_{0-A} = 53.73$ $\mu\text{g/mL}$ 。则 $u_{\rho-A} =$

$$\frac{9860}{31562} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{10} + \frac{(53.73 - 55.82)^2}{2493}} = 2.42 \times 10^{-1}, u_{\text{rel}-A}(\text{标}_\rho) = \frac{2.42 \times 10^{-1}}{53.73} = 4.50 \times 10^{-3}。$$

由标准曲线校准计算得到 Sample B 咖啡因质量浓度为

$$\rho_{0-B} = 2.660 \mu\text{g/mL}。则 u_{\rho-B} = \frac{446}{32205} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{10} + \frac{(2.660 - 2.344)^2}{20.44}} = 1.08 \times 10^{-2}, u_{\text{rel}-B}(\text{标}_\rho) = \frac{1.08 \times 10^{-2}}{2.660} = 4.06 \times 10^{-3}。$$

3.2.2 被测样品均匀性和处理过程一致性引入的相对标准不确定度 ($u_{\text{rel}}(\text{样})$)

(1) 样品称量引入的相对标准不确定度 ($u_{\text{rel}}(\text{样}_m)$)

同 3.2.1(2), 样品称量采用精度 $d=0.0001$ g 的电子天平称量, $e=10d$ 即 $e=1$ mg, 称量量约为 1 g。

表 1 量具的相对标准不确定度
Table 1 Relative standard uncertainty of measuring tools

用途	量具	使用次数	使用容量/mL	容量允差/mL	温度波动/°C	体积膨胀数/°C ⁻¹	$u_{\text{rel}} \text{ 校准}$	$u_{\text{rel}} \text{ 温度}$	合成 u_{rel}	次数合成 u_{rel}
Sample A 标准 曲线配制过程	50 mL 容量瓶(A 级)	1	50	±0.05	8	1.19×10^{-3}	5.77×10^{-4}	2.75×10^{-3}	2.81×10^{-3}	$\sqrt{0.00281^2 + 0.00349^2 + 0.00349^2 + 0.00349^2 + 0.000645^2} \times 5 = 8.42 \times 10^{-3}$
	10 mL 移液器	1	3	±0.018	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-3}	4.78×10^{-4}	3.49×10^{-3}	
	10 mL 移液器	1	4	±0.024	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-3}	4.78×10^{-4}	3.49×10^{-3}	
	10 mL 移液器	1	5	±0.030	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-3}	4.78×10^{-4}	3.49×10^{-3}	
	10 mL 移液器	1	6	±0.036	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-3}	4.78×10^{-4}	3.49×10^{-3}	
	10 mL 移液器	1	7	±0.042	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-3}	4.78×10^{-4}	3.49×10^{-3}	
	200 mL 容量瓶(A 级)	5	200	±0.15	8	2.07×10^{-4}	4.33×10^{-4}	4.78×10^{-4}	6.45×10^{-4}	
Sample A 样品 定容过程	250 mL 容量瓶(A 级)	2	250	±0.15	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-4}	4.78×10^{-4}	5.90×10^{-4}	$\sqrt{0.000590^2} \times 2 = 8.34 \times 10^{-4}$
	50 mL 容量瓶(A 级)	1	50	±0.05	8	1.19×10^{-3}	5.77×10^{-4}	2.75×10^{-3}	2.81×10^{-3}	
	5 mL 移液器	1	5	±0.03	8	1.19×10^{-3}	3.46×10^{-3}	2.75×10^{-3}	4.42×10^{-3}	
	50 mL 容量瓶(A 级)	1	50	±0.05	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-4}	4.78×10^{-4}	7.49×10^{-4}	
	5 mL 移液器	1	0.5	±0.005	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-3}	4.78×10^{-4}	5.79×10^{-3}	
	5 mL 移液器	1	1	±0.01	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-3}	4.78×10^{-4}	5.79×10^{-3}	
	5 mL 移液器	1	2	±0.01	8	2.07×10^{-4}	2.89×10^{-3}	4.78×10^{-4}	2.93×10^{-3}	
Sample B 标准 曲线配制过程	5 mL 移液器	1	3	±0.015	8	2.07×10^{-4}	2.89×10^{-3}	4.78×10^{-4}	2.93×10^{-3}	$\sqrt{0.00281^2 + 0.00442^2 + 0.000749^2 + 0.00579^2 + 0.000579^2 + 0.00293^2 + 0.00349^2 + 0.00349^2} = 1.12 \times 10^{-2}$ $+0.000645^2 \times 5$
	5 mL 移液器	1	4	±0.024	8	2.07×10^{-4}	3.46×10^{-3}	4.78×10^{-4}	3.49×10^{-3}	
	200 mL 容量瓶(A 级)	5	200	±0.15	8	2.07×10^{-4}	4.33×10^{-4}	4.78×10^{-4}	6.45×10^{-4}	
	100 mL 容量瓶(A 级)	2	100	±0.10	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-4}	4.78×10^{-4}	7.49×10^{-4}	
	100 mL 容量瓶(A 级)	2	100	±0.10	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-4}	4.78×10^{-4}	7.49×10^{-4}	
	100 mL 容量瓶(A 级)	2	100	±0.10	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-4}	4.78×10^{-4}	7.49×10^{-4}	
	100 mL 容量瓶(A 级)	2	100	±0.10	8	2.07×10^{-4}	5.77×10^{-4}	4.78×10^{-4}	7.49×10^{-4}	

表 2 标准曲线拟合结果计算
Table 2 Results of standard curve fitting

	浓度 $\rho/(\mu\text{g/mL})$	峰面积 A_1	峰面积 A_2	n	$\bar{\rho}/(\mu\text{g/mL})$	标准曲线	S	$S_{xx}/(\mu\text{g/mL})^2$
Sample A 标准曲线	33.49	1051249	1051007	10	55.82	$A = 31562\rho - 2296$ 相关系数 $r=0.9998$ 斜率 $B_1=31562$ 截距 $B_0=-2296$	9860	2493
	44.66	1412216	1405964					
	55.82	1773114	1753526					
	66.98	2124604	2101162					
	78.15	2471164	2450865					
Sample B 标准曲线	0.5582	18114	18012	10	2.344	$A = 32205\rho - 267.17$ 相关系数 $r=0.9999$ 斜率 $B_1=32205$ 截距 $B_0=-267.17$	446	20.44
	1.116	35705	35348					
	2.233	71381	70966					
	3.349	107509	107956					
	4.466	143165	144189					

在 50 g 量程范围内, 天平示值误差为 $0.3e$ 即 0.3 mg, 则其区间半宽度为 0.3 mg, $u(\text{样}_{m1}) = \frac{0.3}{\sqrt{3}} = 1.73 \times 10^{-1}$ mg。天平的重复性误差为 $0.1e$ 即 0.1 mg, 则其区间半宽度为 0.05 mg, $u(\text{样}_{m2}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-2}$ mg。天平分辨力为 0.1 mg, 则其区间半宽度为 0.05 mg, $u(\text{样}_{m3}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-2}$ mg。天平仪器偏载误差为 $-0.3e$ 即 -0.3 mg, 则其区间半宽度为 0.3 mg, $u(\text{样}_{m4}) = \frac{0.3}{\sqrt{3}} = 1.73 \times 10^{-1}$ mg。

样品质量是由 2 次称量所得(去皮和样品称量), 因此以上 4 项合成标准不确定度为:
 $u(\text{样}_m) = \sqrt{2 \times (0.173^2 + 0.0289^2 + 0.0289^2 + 0.173^2)} = 3.51 \times 10^{-1}$ mg。

Sample A 称取样品 2 份, 称样量分别为 1.0099 g 和 1.0012 g。则样品称量引入的相对合成标准不确定度
 $u_{rel}(\text{样}_{m-A}) = \sqrt{0.000351^2 \times (\frac{1}{1.0099^2} + \frac{1}{1.0012^2})} = 4.94 \times 10^{-4}$ 。

Sample B 称取样品 2 份, 称样量分别为 1.0025 g 和 1.0046 g。则样品称量引入的相对合成标准不确定度
 $u_{rel}(\text{样}_{m-B}) = \sqrt{0.000351^2 \times (\frac{1}{1.0025^2} + \frac{1}{1.0046^2})} = 4.95 \times 10^{-4}$ 。

(2) 样品定容引入的相对标准不确定度($u_{rel}(\text{样}_v)$)

Sample A 定容至 250 mL 容量瓶, Sample B 定容至 100 mL 容量瓶, 根据 JJG 196-2006《常用玻璃量器》^[14], 从表 1 计算样品定容过程引入的相对标准不确定度
 $u_{rel}(\text{样}_{v-A}) = 8.34 \times 10^{-4}$; $u_{rel}(\text{样}_{v-B}) = 1.06 \times 10^{-3}$ 。

(3) 重复性引入的相对标准不确定度($u_{rel}(\text{样}_\omega)$)

对样品进行 6 次重复性试验评价, Sample A 结果为: 13.35、13.49、13.27、13.37、13.37、13.35 g/kg, 平均值

为: 13.37 g/kg; Sample B 结果为: 267.9、261.9、265.1、264.9、267.2、259.9 mg/kg, 平均值为: 264.5 mg/kg。利用格拉布斯准则对观测值进行异常值判别, Sample A 和 Sample B 的 6 个数据, 残差绝对值最大者的 G 值分别为 1.69 和 1.49, 均小于 5% 临界值 $G(0.05, 6) = 1.82$, 因此无异常值, 全部数据均可采用^[15, 16]。按 A 类评定应用贝塞尔公式计算 $s-A = 0.0710$ g/kg, $s-B = 3.08$ mg/kg; 在实际测量中, 连续测量 2 次的平均值作为测量结果, 则标准不确定度
 $u(\text{样}_{\omega-A}) = \frac{0.0710}{\sqrt{2}} = 0.0502$ g/kg, $u(\text{样}_{\omega-B}) = \frac{3.08}{\sqrt{2}} = 2.18$ mg/kg; 则被测样品平行实验重复性引入的相对标准不确定度
 $u_{rel}(\text{样}_{\omega-A}) = \frac{0.0502}{13.36} = 3.76 \times 10^{-3}$, $u_{rel}(\text{样}_{\omega-B}) = \frac{2.18}{265.0} = 8.23 \times 10^{-3}$ 。

3.2.3 液相色谱仪引入的相对标准不确定度($u_{rel}(\text{仪})$)

由校准证书上可知, 实验用 2695 高效液相色谱仪定量测量重复性 $RSD = 0.4\%$, 则相对扩展不确定度为 0.4%, 按均匀分布计算, 则液相色谱仪的相对标准不确定度
 $u_{rel}(\text{仪}) = \frac{0.004}{\sqrt{3}} = 2.31 \times 10^{-3}$ 。

3.2.4 相对标准合成不确定度的计算

测量相对标准不确定度各分量的分析结果见表 3。图 1 为各分量和相对合成标准不确定度的柱状图, 可以更加清晰看到 2 个样品的不确定均主要来源于标准曲线配制过程、样品重复性和标准曲线拟合 3 个部分。

由公式(2)计算相对合成标准不确定度为:

$$\begin{aligned}
 &u_{rel}(\omega_A) \\
 &= \sqrt{0.000578^2 + 0.000676^2 + 0.00842^2 + 0.00450^2 + 0.000494^2 + 0.000837^2 + 0.00375^2 + 0.00231^2} \\
 &= 0.0106 \\
 &u_{rel}(\omega_B) \\
 &= \sqrt{0.000578^2 + 0.000676^2 + 0.0112^2 + 0.00406^2 + 0.000495^2 + 0.00106^2 + 0.00823^2 + 0.00231^2} \\
 &= 0.0147
 \end{aligned}$$

表 3 各分量相对标准不确定度一览表
Table 3 Relative standard uncertainty of each component

分量	不确定度来源	分布	类型	Sample A 相对标准不确定度	Sample B 相对标准不确定度
$u_{\text{rel}}(\text{标}_p)$	标准物质纯度	均匀	B类	5.78×10^{-4}	5.78×10^{-4}
$u_{\text{rel}}(\text{标}_m)$	标准物质称量	均匀	B类	6.76×10^{-4}	6.76×10^{-4}
$u_{\text{rel}}(\text{标}_v)$	标准曲线配制过程	均匀	B类	8.42×10^{-3}	1.12×10^{-2}
$u_{\text{rel}}(\text{标}_\rho)$	标准曲线拟合	正态	A类	4.50×10^{-3}	4.06×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(\text{样}_m)$	样品称量	均匀	B类	4.94×10^{-4}	4.95×10^{-4}
$u_{\text{rel}}(\text{样}_v)$	样品定容	均匀	B类	8.34×10^{-4}	1.06×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(\text{样}_\omega)$	样品重复性	正态	A类	3.76×10^{-3}	8.23×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(\text{仪})$	液相色谱仪定量重复性	均匀	B类	2.31×10^{-3}	2.31×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(\omega)$	/	/	/	1.06×10^{-2}	1.47×10^{-2}

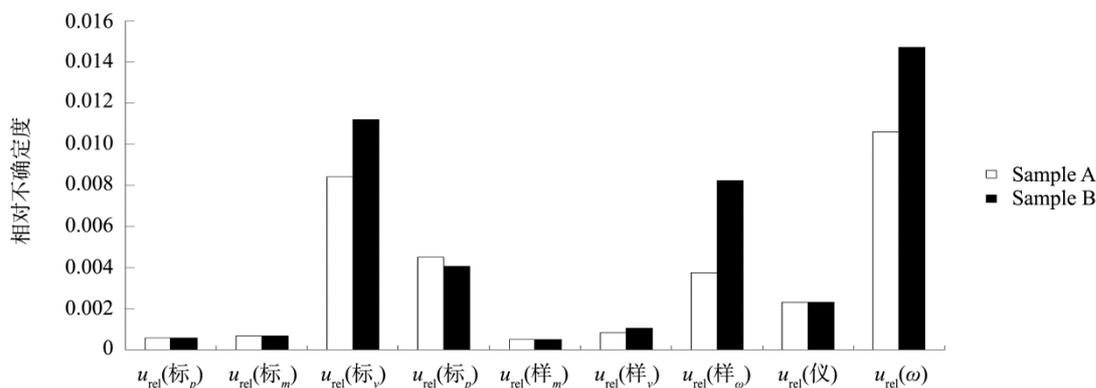


图 1 各分量相对标准不确定度
Fig.1 Relative standard uncertainty of each component

3.2.5 相对标准扩展不确定度

根据模型和 2 次独立样品的实验结果得到 Sample A 和 Sample B 含量。因此，其平均含量的相对标准不确定度分别为： $u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_A) = \frac{0.0106}{\sqrt{2}} = 0.00750$ ； $u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_B) = \frac{0.0147}{\sqrt{2}} = 0.00962$ 。

取置信概率为 95%，包含因子 $k=2$ ，则相对标准扩展不确定度 $U_{\text{rel}}(\bar{\omega}_A) = k u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_A) = 2 \times 0.00750 = 0.0150$ ； $U_{\text{rel}}(\bar{\omega}_B) = k u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_B) = 2 \times 0.00962 = 0.0192$ 。

3.2.6 标准扩展不确定度及不确定度报告

2 次独立样品的实验结果得到 Sample A 和 Sample B 含量分别为： $\bar{\omega}_A = 13.36 \text{ g/kg}$ ， $\bar{\omega}_B = 265.0 \text{ mg/kg}$ ；标准扩展不确定度 $U(\bar{\omega}_A) = \bar{\omega}_A U_{\text{rel}}(\bar{\omega}_A) = 13.36 \times 0.0150 = 0.21 \text{ g/kg}$ ， $U(\bar{\omega}_B) = \bar{\omega}_B U_{\text{rel}}(\bar{\omega}_B) = 265.0 \times 0.0192 = 5.1 \text{ mg/kg}$ 。

在报告测量结果时，不确定度 U 都只能是 1~2 位有效数字；同时，在保留位数时，可四舍五入，也可为保险起见，将不确定度的保留位数末尾后的数字全部进位而不是

舍去^[16]。Sample A 中咖啡因的含量不确定度报告为： $\omega_A = (13.36 \pm 0.21) \text{ g/kg}$ ， $k=2$ ；Sample B 中咖啡因的含量不确定度报告为： $\omega_B = (265.0 \pm 5.1) \text{ mg/kg}$ ， $k=2$ 。

3.3 Fapas 能力验证结果

本次实验咖啡因含量的测定为实验室在 2019 年 6 月参加 Fapas 国际能力验证项目，能力验证报告中^[8]，Sample A 咖啡因含量指定值为 14.3 g/kg ，扩展不确定度为 0.2 g/kg ；Sample B 指定值为 256 mg/kg ，扩展不确定度为 12 mg/kg 。实验室检验结果 Sample A 含量为 13.36 g/kg ，扩展不确定度为 0.21 g/kg ，Sample B 含量为 265.0 mg/kg ，扩展不确定度 5.1 mg/kg 。比对结果报告给出 Sample A 和 Sample B 的 Z 值分别为为 -1.8 和 0.1 ，2 个样品检测结果均符合能力验证满意判定标准 ($|Z| \leq 2$)^[17]，更加说明实验室在不同的浓度水平上均有能力开展相关检测并能保证数据可靠。

4 结论与讨论

通过对标准物质纯度、标准物质称量、标准曲线配制

过程、标准曲线拟合、样品称量、样品定容、样品重复性、液相色谱仪定量重复性不确定度分量进行分析和评估, 发现在测定高、低 2 个浓度水平研磨咖啡粉中咖啡因含量的不确定度均主要来源于标准曲线配制过程、样品重复性和标准曲线拟合 3 部分。其相对较大的原因可能有: 标准曲线配制过程多次使用量具和溶液, 量具校准和温度波动对不确定度影响较大; 样品处理过程中沸水浴震荡萃取等操作过程影响样品测量重复性; 标准曲线拟合与标准系列溶液测定次数较少有关。

本文采用 GB 5009.139-2014 高效液相色谱法对 Fapas 能力验证样品中咖啡因的含量测定进行不确定度分析, 不确定度主要来源为标准曲线配制过程、样品重复性和标准曲线拟合 3 部分。因此, 为了提高检测数据准确度, 需定期对量具进行检定校准、严格控制实验室温度; 优化样品重复性测定过程, 如沸水浴震荡过程充分确保目标物质萃取完全; 适当增加标准系列溶液的测定次数等。同一实验室同一设备在稳定状态下, 部分不确定度分量基本不变, 比如电子天平称重带来的不确定度, 在条件不变的情况下, 实验室可以将其作为固定参数使用, 简化不确定度的评定程序。同时, 此次研究为评价咖啡因含量测定结果的质量和实验室内部质量提供参考, 并能确保实验室在国际比对项目中取得满意结果。

参考文献

- [1] 叶德培. 测量不确定度理解、评定与应用[M]. 北京: 中国质检出版社, 2013.
Ye DP. Comprehending, evaluation and application of uncertainty in measurement [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2013.
- [2] 刘智敏. 稳健统计与实验室不确定度和能力验证[J]. 中国计量学院学报, 2006, 17(1): 8-16.
Liu ZM. Robust statistics with uncertainty and proficiency testing in laboratory [J]. J Chin Jiliang Univ, 2006, 17(1): 8-16.
- [3] 李涛, 周艳华, 杨滔, 等. UPLC-MS/MS 法测定虾肉中氯霉素残留量的不确定度分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 61-64, 99.
Li T, Zhou YH, Yang T, *et al.* Uncertainty analysis of determination of chloramphenicol residue in shrimp by UPLC-MS/MS method [J]. Food Mach, 2017, 33(7): 61-64, 99.
- [4] 邓慧芸. 磁性表面分子印迹微球的制备、表征及对咖啡因的分离分析研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019.
Deng HY. Preparation and characterization of magnetic surface molecularly imprinted microspheres and its utilization on separation and analysis for caffeine [D]. Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology, 2019.
- [5] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [6] CNAS-GL 006: 2019 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 006: 2019 Guidance on quantifying uncertainty in chemical analysis [S].
- [7] GB 5009.139-2014 食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定[S].
GB 5009.139-2014 National food safety standard-Determination of caffeine in beverage [S].
- [8] Fapas-Food chemistry proficiency test report 03151 [Z].
- [9] 王海燕, 李彬, 孙磊, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中苯氧乙醇含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 128-133.
Wang HY, Li B, Sun L, *et al.* Uncertainty evaluation in determination of 2-phenoxyethanol in cosmetic by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual. 2020, 11(1): 128-133.
- [10] 王涛, 李卓, 贾寒冰, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中苯扎氯铵含量的不确定度评定[J]. 日用化学工业, 2018, 48(8): 466-471.
Wang T, Li Z, Jia HB, *et al.* Evaluation of uncertainty in the determination of benzalkonium chloride in cosmetics by HPLC [J]. Chin Surf Deter Cosmet, 2018, 48(8): 466-471.
- [11] JJG 1036-2008 电子天平[S].
JJG 1036-2008 Electronic balance [S].
- [12] JJG 646-2006 移液器[S].
JJG 646-2006 Locomotive pipette [S].
- [13] 程能林. 溶剂手册(第三版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
Cheng NL. Solvents Handbook[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [14] JJG 196-2006 常用玻璃量器[S].
JJG 196-2006 Working glass container [S].
- [15] GB/T 6379.2-2004 测量方法与结果的准确度 第 2 部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法[S].
GB/T 6379.2-2004 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 2: Basic method for the determination of repeat ability and reproducibility of a standard measurement method [S].
- [16] 中国计量测试学会. 一级注册计量师基础知识及专业实务(第 4 版)[M]. 北京: 中国质检出版社, 2017.
Chinese Society For Measurement. Basic knowledge and professional practice of certified metrologist I (version 4) [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2017.
- [17] GB/T 27043-2012 合格评定 能力验证的通用要求[S].
GB/T 27043-2012 Conformity assessment-General requirements for proficiency testing [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李 彬, 工程师, 主要研究方向为食品化妆品检测。

E-mail: libin@nifdc.org.cn