

文章编号: 1673 1689(2010)05-0726-04

高效液相色谱法测定烟草薄片涂布液中 苯甲酸含量的不确定度评价

白晓莉, 牟定荣, 董伟, 龚荣岗
(红塔烟草(集团)有限责任公司, 云南 玉溪 653100)

摘要: 对高效液相色谱法测定烟草薄片涂布液中苯甲酸含量的测量不确定度进行评定。建立数学模型, 分析不确定度来源。

关键词: 高效液相色谱法; 烟草薄片涂布液; 苯甲酸; 不确定度

中图分类号: TS 47

文献标识码: A

Measurement Uncertainty in the Determination of Benzoic Acid in Reconstituted Tobacco Sheet with HPLC

BAI Xiao-li, MOU Ding-rong, DONG Wei, GONG Rong-gang
(Hongta Tobacco (Group) Corporation, Yuxi 653100, China)

Abstract: This manuscript study the measurement uncertainty during the determination of benzoic acid in the reconstituted tobacco sheets by high performance liquid chromatography (HPLC). For this, a mathematic model was established and the source of the uncertainty was analyzed. Each components of uncertainty was estimated by analyzing the various variable parameters among the procedures, the combined uncertainty was then finally determined by synthesizing the uncertainties of various component variables. The results showed the mathematic model was reasonable and reliable.

Key words: HPLC, Size for reconstituted tobacco sheet, Benzoic acid, Uncertainty

防腐剂是抑制物质腐败的药剂, 即对以腐败物质为代谢底物的微生物的生长具有持续的抑制作用。在烟草薄片生产过程中, 常添加我国规定使用的防腐剂如苯甲酸等来抑制微生物的生长和繁殖, 以延长其保存时间。苯甲酸在体内无蓄积作用, 曾被认为是相对安全的防腐剂。但过量摄入防腐剂会对人体产生一定的毒性, 如过量摄入苯甲酸和苯甲酸钠, 会影响肝脏酶对脂肪酸的作用。另外, 苯

甲酸钠对人体血压、心脏、肾功能也会产生一定的不良影响^[1], 还可能发生有代谢性酸中毒、惊厥和气喘等病症^[2, 3]。

有关苯甲酸的测定方法主要有薄层色谱法、分光光度法^[4]、液相色谱法、气相色谱法等。高效液相色谱法已广泛用于其定量检测, 为了符合中国实验室国家认可委员会(CNAL)认可规则 CNAL/AR11: 2002 测量不确定度政策^[5] 和为了在测量数

收稿日期: 2009-09-11

基金项目: 云南中烟工业公司项目。

作者简介: 白晓莉(1978-), 女, 陕西清涧人, 工程师, 主要从事烟草化学研究。Email: baixiaoli@hongta.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

据的处理、测量结果的表达和测量结果质量评定等方面与国际接轨, 根据 JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》^[6], 参考了有关食品中苯甲酸的测定方法标准及相关文献^[7-11], 对高效液相色谱法测定烟草薄片涂布液中苯甲酸的测量不确定度进行了测量和评定。

1 材料与 方法

1 测量方法

1.1 仪器与试剂

Aglient 1100 高效液相色谱仪; 甲醇(色谱纯): 天津市康科德科技有限公司产品; 乙酸铵(分析纯): 天津市化学试剂二厂产品。

1.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: $V(\text{甲醇}) : V(0.02 \text{ mol/L 乙酸铵溶液}) = 5 : 95$; 流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 进样量: 10 μL。

1.3 溶液的配制

对照品溶液的配制: 精确称取苯甲酸对照品 26.0 mg, 加碳酸氢钠溶液(20 g/L) 5 mL, 充分溶解, 分别置 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

样品溶液的配制: 精确量取液态烟草薄片涂布液 1 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

2 数学模型

样品中苯甲酸含量测定采用外标法, 公式为:

$$X = \frac{A_x}{A_0} \times C_0$$

式中 X 为样品中苯甲酸的质量浓度, mg/mL; A_x 为样品中苯甲酸的峰面积; A_0 为标样中苯甲酸的峰面积; C_0 为标样中苯甲酸的质量浓度, mg/mL。

经过对上面公式的分析, 样品含量测定的不确定度主要由 C_0 、 A_x 、 A_0 (重复进样所得) 等 3 个分量所引入的不确定度所组成。

3 不确定度来源

从测量过程和数学模型分析, 苯甲酸含量测定的不确定度主要来源于标准物质, 样品峰面积的测量, 仪器的响应值和测量和样品处理操作过程的差异, 每一种来源又分别受不同因素的影响, 其不确定度来源可归纳为以下几方面。

1) 标样溶液浓度引起的合成相对标准不确定度 主要包括: 标准物质引入的不确定度; 称量产生的不确定度; 标准工作液配制过程量器校准产生的不确定度; 标准工作液配制过程温度变化产生的不确定度。

2) 标样和样品重复进样引起的相对标准不确定度

3) 样品处理后的总体积 V 的标准不确定度 主要包括: 容量瓶校准的不确定度; 温度变化产生的不确定度。

4) 试样均匀性和处理操作过程产生的不确定度

4 标准不确定度分量的评定

根据标准不确定度来源分别进行不确定度的评定。

4.1 标样溶液浓度引起的合成相对标准不确定度 $U(C_0)$

4.1.1 标准物质含量引起的相对标准不确定度 $U(P)$ 标样含量的允差极值 ΔP 为 $\pm 0.03\%$, 按均匀分布转化

$$U(P) = \frac{\Delta P}{\sqrt{3}} = \frac{0.0003}{\sqrt{3}} = 0.00017 \quad (2)$$

4.1.2 样品称量引起的相对标准不确定度 $U(W)$

1) 电子天平校准不确定度 $U(W)_1$ 天平校准的允许误差极值为 ΔW 为 $\pm 0.0001 \text{ g}$, 按正态分布, 取置信概率 $k = 2$, 则

$$U(W)_1 = \frac{\Delta W}{k} = \frac{0.0001}{2} = 0.00005$$

2) 样品称量变动性 $U(W)_2$ 对约 10 mg 的样品重复测量 10 次, 标准偏差 $S = 0.014 \text{ mg}$, 自由度为 9, 则

$$U(W)_2 = S/9 = 0.000005$$

3) 标准物质的称样量为 26.1 mg, 按照不确定度计算公式 $U(W) = \frac{\sqrt{U(W)_1^2 + U(W)_2^2}}{0.0261} = 0.00192$

4.1.3 配置 100 mL 标样溶液引起的相对标准不确定度 $U(V)$

1) 100 mL 单标线容量瓶引起的不确定度 $U(V)_1$ A 级 100 mL 单标线容量瓶的允差极值 ΔV 为 $\pm 0.10 \text{ mL}$, 按均匀分布转化

$$U(V)_1 = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} = \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.06$$

2) 重复性: 根据本实验经验 A 级 100 mL 单标线容量瓶读数重复性 $\pm 0.02 \text{ mL}$, 取 $k = \sqrt{3}$, 则 U

$$(V)_2 = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 0.012$$

3) 温度: 由容量瓶和溶液的温度与使用时温度差别引起的不确定度 $U(V)_3$

在实验中测量温度 $T_1 = 23\text{ }^\circ\text{C}$, 容量瓶校正温度 $T_0 = 20\text{ }^\circ\text{C}$, 查得水和玻璃体积膨胀系数(α)为 2.1×10^{-4} 和 1.5×10^{-5} , 则

$$\Delta V = (\alpha_{\text{水}} - \alpha_{\text{玻}}) \times 250 \times (T_1 - T_0) = 0.01625, \text{取 } k = 2$$

$$U(V)_3 = \frac{0.01625}{2} = 0.00813$$

4) 按照不确定度计算公式

$$U(V) = \frac{\sqrt{U(V)_1^2 + U(V)_2^2 + U(V)_3^2}}{100} = 0.000617$$

4) 标样溶液浓度引起的合成相对标准不确定度 $U(C_0)$

$$U(C_0) = \sqrt{U(P)^2 + U(W)^2 + U(V)^2} = 0.00209$$

4.2 标样和样品重复进样引起的相对标准不确定度 $U(A_0)$ 、 $U(A_x)$

通过重复进样进行评定, 它包含试样进样量的不确定度, 该不确定度属 A 类评定。 $U(A_0)$ 与 $U(A_x)$ 的不确定度主要由重复进样引起, 由仪器给出标准溶液峰面积和样品峰面积, 计算不确定度 $U(A_0)$ 、 $U(A_x)$ 。

苯甲酸标样溶液作 5 次重复测量的峰面积如下: 2.870 6、2.859 0、2.862 0、2.863 4、2.871 2。平均值 $\bar{A}_0 = 2.865.38$, 标准溶液峰面积的标准不确定度按贝塞尔公式计算

$$U(A_0) = \frac{\sqrt{\frac{\sum(A_0 - \bar{A}_0)^2}{n(n-1)}}}{\bar{A}_0} = 0.00085$$

苯甲酸样品溶液作 5 次重复测量的峰面积如下: 2.061 4、2.055 7、2.055 6、2.057 1、2.059 2。平均值 $\bar{A}_x = 2.057.94$, 样品溶液峰面积的标准不确定度按贝塞尔公式计算

$$U(A_x) = \frac{\sqrt{\frac{\sum(A_x - \bar{A}_x)^2}{n(n-1)}}}{\bar{A}_x} = 0.00054$$

4.3 样品定容体积 V 产生的相对标准不确定度

4.3.1 容量瓶校准不确定度 样品处理后用 10 mL 的 B 级容量瓶定容, 根据 JJG196-90《常用玻璃量具检定规程》^[12], 其最大允许误差 ± 0.020 mL, 按矩形分布考虑。

$$U(V)_1 = \Delta y / k = 0.020 / 2 = 0.01$$

4.3.2 定容时由体积重复性产生的相对标准不确定度 对 25 mL 容量瓶分别进行 10 次移液称量,

得到相对标准偏差为 0.06%, 可直接作为移取时由体积重复性产生的相对标准不确定度使用。即

$$U(V)_2 = 0.0006$$

4.3.3 温度效应引入的不确定度 容量瓶由温度效应引入的相对标准不确定度同 4.1(3) C, 即:

$$U(V)_3 = 0.00815 \text{ mL}$$

合成上述分量, 即得试样定容体积 V 引入的相对标准不确定度:

$$U(V) = \frac{\sqrt{U(V)_1^2 + U(V)_2^2 + U(V)_3^2}}{10} = 0.00282$$

4.4 试样均匀性和处理操作过程(frep)产生的不确定度的评定

检测结果的重现性主要受操作人员的样品处理过程的一致性, 样品的均匀性和仪器本身的性能因素影响, 该不确定度属 A 类评定, 采用同一样品进行重复实验进行评估。其重复实验结果见表 1 重复 0.045 1, 0.053 2, 0.061 2, 0.062 4, 0.063 4, 0.057 4, 0.054 4, 0.051 2, 0.056 0 mg/mL。

单次测量结果的标准偏差:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.00629;$$

标准不确定度:

$$u_2 = \frac{S_x}{\sqrt{n}} = \frac{0.00629}{\sqrt{8}} = 0.00222;$$

相对不确定度为:

$$u_{2r} = \frac{u_2}{\bar{X}} = \frac{0.00222}{0.056} = 0.0396$$

4.5 合成标准不确定度评定

$$U_x = \sqrt{U(C_0)^2 + U(A_0)^2 + U(A_x)^2 + U_{2r}^2} = 0.00365$$

4.6 扩展不确定度评定

扩展不确定度可由合成标准不确定度乘以包含因子, 取置信概率 $p = 95\%$, 则 $k = 2$, 因此, 茶叶料中苯甲酸含量测定的相对扩展不确定度为:

$$U = U_x \times k = 0.00365 \times 2 = 0.0073$$

由实验数据的平均值计算得试样中苯甲酸含量的最佳估计值 $C_x = 0.056$ mg/mL, 故其扩展不确定度为:

$$U_k = 0.0073 \times 0.056 = 0.00041$$

4.7 测量不确定度报告

计算得该烟草薄片涂布液样品中苯甲酸的质量浓度为 (69.1 ± 0.41) mg/L。

5 结 语

通过对各变量的分析, 计算各变量的不确定

度,最后计算出合成标准不确定度。该方法建立的数学模型合理、可靠。

参考文献(References):

- [1] 高鹤鹑. 食品中的有害物质[M]. 北京: 北京工业出版社, 2001.
- [2] 牟冠文, 李光浩. 食品防腐剂的概况及其检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32 (10): 103– 1071.
MU Guān wén, Lǐ Guāng hào. The introduction of food preservatives and their determination technology[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2006, 32 (10): 103– 1071. (in Chinese)
- [3] WHO. Evaluation of some food additives and contaminants[J]. **Technical Report Series**, 1997, 868: 1– 69.
- [4] GB5009– 1985. 食品中山梨酸、苯甲酸的测定方法[S]
- [5] 中国实验室国家认可委员会. 实验室认可与管理基础知识[M]. 北京: 中国计量出版社, 2003: 176.
- [6] JJF1059– 1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 2000.
- [7] 彭巨成. 高效液相色谱法同时测定食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠[J]. 中国热带医学, 2005, 5 (4): 810– 816.
PENG Jū chéng. Simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid and saccharin sodium in food by using high performance liquid phase chromatography[J]. **China Tropical Medicine**, 2005, 5 (4): 810– 816. (in Chinese)
- [8] 黄百芬, 张文娟, 沈向红. 高效液相色谱法同时测定酱油或饮料中的 8 种防腐剂和 3 种甜味剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(10) : 1208– 1211.
HUANG Bǎi fēng, ZHANG Wén juān, SHEN Xiāng hóng. Simultaneous determination of 8 preservatives and 3 sweet enings in beverages by high performance liquid chromatography[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2005, 15(10) : 1208– 1211. (in Chinese)
- [9] 祝伟霞, 魏蔚, 杨冀州等. 高效液相色谱法测定乳饮料和奶制品中苯甲酸和山梨酸[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2005, 28 (5): 280– 282.
ZHU Wēi xiá, WÈI Wēi, YÁNG Jì zhōu. The determination of benzoic and sorbic acid in milk productions or dairy drinks by high performance liquid chromatography[J]. **Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine**, 2005, 28 (5): 280– 282. (in Chinese)
- [10] 吕孝丽, 徐烨, 雷雅娟. 高效液相色谱法同时测定饮料中的着色剂、甜味剂与防腐剂[J]. 当代化工, 2007, 36 (2): 202– 205.
LV Xiǎo lì, XÚ Yē, LÉI Yǎ juān. The determined simultaneously of many colorants, preservatives and sweeteners by high performance liquid chromatography[J]. **Contemporary Chemical Industry**, 2007, 36 (2): 202– 205. (in Chinese)
- [11] JJG196– 90 常用玻璃量具检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2000. 4– 6.

(责任编辑: 朱明)