

荧光分光光度法测定乳粉中维生素C含量的不确定度评定

王竹青*, 唐钰娜, 汤陈龙, 陈晓雅, 周雨蝶, 王森焱, 巩启强, 叶磊海

浙江公正检验中心有限公司, 浙江 杭州

收稿日期: 2024年2月7日; 录用日期: 2024年5月2日; 发布日期: 2024年5月13日

摘要

为了提高实验室检测数据的准确性, 本文依据GB5413.18-2010《婴幼儿和乳品中维生素C的测定》方法, 分析乳品中维生素C测定过程中的不确定度来源, 建立了不确定度评估数学模型, 评定出各不确定度分量。结果表明, 当乳粉样品中维生素C的含量为52.0 mg/100g, 扩展不确定度为3.0 mg/100mg, 重复性测量和校准曲线的拟合是不确定度的主要来源。

关键词

乳粉, 维生素C, 不确定度

Uncertainty Assessment of Vitamin C Content in Milk Powder by Fluorescence Spectrophotometry

Zhuqing Wang*, Yu'na Tang, Chenlong Tang, Xiaoya Chen, Yudie Zhou, Senyi Wang, Qiqiang Gong, Leihai Ye

Zhejiang Gongzheng Testing Center, Inc., Hangzhou Zhejiang

Received: Feb. 7th, 2024; accepted: May 2nd, 2024; published: May 13th, 2024

Abstract

In order to improve the accuracy of laboratory test results, this article analyzed the sources of un-
*通讯作者。

文章引用: 王竹青, 唐钰娜, 汤陈龙, 陈晓雅, 周雨蝶, 王森焱, 巩启强, 叶磊海. 荧光分光光度法测定乳粉中维生素C含量的不确定度评定[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(2): 177-183. DOI: 10.12677/hjfn.2024.132022

certainty in the determination of vitamin C in dairy products based on the GB5413.18-20210 method "Determination of Vitamin C in Infants and Dairy Products", established a mathematical model for uncertainty evaluation, and evaluated each uncertainty component. The results indicated that when the content of vitamin C in milk powder samples was 52.0 mg/100g, the extended uncertainty was 3.0 mg/100mg, and the fit of repeatability measurement and calibration curve was the main source of uncertainty.

Keywords

Milk Powder, Vitamin C, Uncertainty

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

维生素 C, 又被称为抗坏血酸, 是一种重要的水溶性维生素。因其具有促进人体新陈代谢、抗氧化、改善肠道功能、促进钙吸收等多种生物活性功能, 是维持人体正常活动不可缺少的重要营养元素之一[1][2]。从化学结构上, 维生素 C 可分为 L 型抗坏血酸和 D 型抗坏血酸, 其中 L - 抗坏血酸还可细分为还原型抗坏血酸($C_6H_8O_6$)和脱氢型抗坏血酸($C_6H_6O_6$), 还原型抗坏血酸易于氧化, 化学性质极不稳定, 易被氧化成脱氢抗坏血酸[3]。

不确定度评定是衡量数据质量可靠性的重要手段, 由于实验过程中测量误差始终存在, 不确定度反映了测量值的分散程度, 是表征测量结果质量的指标, 其数值大小反映了测量结果质量的高低, 并影响检验结果的符合性判定对被测量值的不能肯定的程度。为了保证检测数据的准确性, 提升检验人员操作的规范性, 明确实验的关键要点, 本文依据《化学分析测量不确定度评定》(JJF 1135-2005) [4]对 GB5413.18-2010《婴幼儿和乳品中国维生素 C 的测定》[5]中各因素进行评估, 根据检测过程的全要素分析, 通过仪器、标物、检测结果等要素进行不确定度评价。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

L - 抗坏血酸: 坛墨质检科技股份有限公司;

偏磷酸: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

冰乙酸、三水合乙酸钠、硼酸: 分析纯, 均购自于上海凌峰化学试剂有限公司;

邻苯二胺: 麦克林生物科技有限公司。

偏磷酸 - 乙酸溶液 A: 准确称取 15 g 偏磷酸用水溶解, 加入 15 mL 冰乙酸, 用超纯水定容至 500 mL。

乙酸钠溶液: 称取 250 g 三水乙酸钠, 用水溶解后并定容至 500 mL。

硼酸 - 乙酸钠溶液: 称取 3.0 g 硼酸, 用乙酸钠溶液(500 g/L)溶解然后稀释到 100 mL。

邻苯二胺溶液: 准确称取 20 mg 邻苯二胺, 用超纯水溶解稀释, 定容至 50 mL。

维生素 C 标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取 L - 抗坏血酸标准品 0.050 g, 用偏磷酸 - 乙酸溶液 A 溶解, 定容到 50.00 mL, 吸取 10.00 mL 用偏磷酸 - 乙酸 A 稀释并定容至 100 mL。

2.2. 主要仪器设备

电子天平: AR224CN 型, 奥豪斯仪器(常州)有限公司;
CARY ECLIPSE 型荧光分光光度计: 美国瓦里安公司;
超纯水仪: 杭州永洁达净化科技有限公司。

2.3. 方法

样品处理

称取乳粉 5 g 于 100 mL 容量瓶中, 加入偏磷酸 - 乙酸溶液 A 溶解后, 定容至 100 mL。

将样品溶液和维生素 C 标准溶液倒入放有约 2.0 g 左右的酸性活性炭的 250 mL 的锥形瓶中, 剧烈振荡, 用中速滤纸过滤, 弃去初滤液, 即为试样及标准溶液的滤液。然后准确吸取 5.0 mL 试样滤液、5.0 mL 标准溶液分别置于 25 mL 及 50 mL 放有硼酸 - 乙酸钠(3 g/100mL)的容量瓶中, 放置 30 min 后, 用水定容。作为样品及标准溶液的空白溶液。

在 30 min 内, 同时吸取 5.0 mL 样品溶液、5.0 mL 标准溶液的滤液于另外放有 5.0 mL 乙酸钠溶液的 25 mL 和 50 mL 的容量瓶, 用蒸馏水稀释, 定容到刻度。作为样品溶液和标准溶液。

样品溶液: 分别移取 2.0 mL 样品溶液和样品空白溶液于 10.0 mL 比色管中, 加入 5.0 mL 邻苯二胺溶液, 摇晃均匀, 于避光处静置 60 min 后测定。

标准系列待测液: 准确吸取 0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 和 2.0 mL 标准溶液, 于 10 mL 试管中, 再用蒸馏水补充至 2.0 mL, 同时移取 2.0 mL 空白溶液于 10 mL 试管中作为空白。依次向每支试管中准确加入 5.0 mL 邻苯二胺溶液, 摇匀后, 于避光处静置 60 min 后测定。

2.4. 测定

2.4.1. 标准曲线绘制

使用荧光分光光度计进行定量测定, 选用 1 cm 石英比色皿, 激发波长为 350 nm, 发射波长为 430 nm 条件下测定其荧光响应值。以维生素 C 标准溶液浓度为横坐标, 以扣除空白值后以标准溶液荧光响应值为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.4.2. 样品溶液测定

按上述方法, 分别测定样品溶液和样品空白溶液的荧光响应值, 扣除空白后计算样品中维生素 C 的浓度。

3. 实验与结果分析

3.1. 数学模型

建立测量值的数学模型进行不确定度的评估, 进而分析其可能的不确定来源。本实验中, 乳粉中维生素 C 含量测定的数学模型可归纳为:

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \times \frac{100}{1000}$$

式中: X ——测试乳粉中维生素 C 的含量, mg/100g;

V ——样品的定容体积, mL;

c ——样品中维生素 C 的浓度, $\mu\text{g/mL}$;

m ——乳粉的质量, g;

f —稀释倍数。

3.2. 测量不确定度的来源

本实验不确定度主要来自：

(1) 标准溶液的不确定度，由标准物质的称样量、标准品纯度、标准溶液的配制过程引入的不确定度，以及校准曲线拟合产生的不确定度。

(2) 样品前处理过程中引入的不确定度，试样的称量过程、试样的定容体积及样品测定重复性引入的不确定度。

3.3. 标准溶液引入的不确定度

3.3.1. 标准品称样引入的不确定度

精确称取 50.10 mg 维生素 C 标准品，加入 20 mL 偏磷酸溶液溶解后，定容至 50.00 mL，配制浓度为 1.00 mg/mL 的标准溶液。

实验室使用的天平允许的最大误差为 ± 0.1 mg，称取维生素 C 标准品 50.10 mg，取矩形分布[6]，其相对标准不确定度为

$$u_1(m) = \frac{a}{k} = \frac{0.1}{50.10 \times \sqrt{3}} = 1.15 \times 10^{-3}$$

3.3.2. 标准品纯度引入的不确定度

查阅维生素 C 标准物质证书，其纯度 P 为 $99.8 \pm 0.2\%$ ，按矩形分布考虑，进行 B 类评定，则维生素 C 标准物质的纯度 P 引入的相对标准不确定度为：

$$u(p) = \frac{0.1}{99.8 \times k} = \frac{0.1}{99.8 \times \sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-4}$$

3.3.3. 标准溶液配制过程中引入的不确定度

标准溶液在配制过程引入的不确定度主要来自于相关配制容器如移液管、容量瓶等的允差以及温度变化引起的误差。其中玻璃量具体积引入的不确定度：根据 JJG196-2006《常用玻璃量具检定规程》[7] 10 mL 单线移液管的允许误差为 ± 0.020 mL，50 mL、100 mL A 级单线容量瓶的允许误差分别为 ± 0.05 mL、 ± 0.10 mL，按矩形分布计算，产生的相对标准不确定度分别为 0.115%、0.0577%、0.0577%，由标准溶液配制过程中合成的相对标准不确定度为：

$$u(v) = \sqrt{(0.00115)^2 + (0.000577)^2 + (0.000577)^2} = 1.41 \times 10^{-3}$$

3.3.4. 溶液温度与校正时的温度不同引起的体积不确定

20℃时水膨胀系数为 $0.00021^\circ\text{C}^{-1}$ [3]，实验室温度变化控制为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 之间，按矩形分布计算，50 mL 容量瓶(A 级)定容因实验室温度变化引起溶剂体积变化的相对标准不确定度：

$$u(f50) = \frac{50 \times 5 \times 0.00021}{50 \times \sqrt{3}} = 6.06 \times 10^{-4}$$

100 mL 容量瓶(A 级)因温度变化引起试样体积变化的相对标准不确定度：

$$u(f100) = \frac{100 \times 5 \times 0.00021}{100 \times \sqrt{3}} = 6.06 \times 10^{-4}$$

溶液温度引起的合成相对不确定度为：

$$u(f) = \sqrt{(0.000606)^2 + (0.000606)^2} = 8.57 \times 10^{-4}$$

3.3.5. 标准物质引入的合成相对标准不确定度 $u_1(c_{ref})$ 为

$$u(c_{ref}) = \sqrt{(u(m))^2 + (u(p))^2 + (u(v))^2 + (u(f))^2}$$

$$= \sqrt{(1.15 \times 10^{-3})^2 + (5.77 \times 10^{-4})^2 + (1.41 \times 10^{-3})^2 + (8.57 \times 10^{-4})^2} = 2.09 \times 10^{-3}$$

3.4. 拟合标准曲线引入的不确定度分析

Table 1. Results of repeated determination of vitamin C ($n = 8$)

表 1. 维生素 C 含量重复测定结果($n = 8$)

序号	m (g)	C ($\mu\text{g/mL}$)	X (mg/100g)
1	5.0559	5.296	52.4
2	5.0723	5.221	51.5
3	5.0552	5.315	52.6
4	5.0422	5.231	51.9
5	5.0328	5.220	51.9
6	5.0225	5.194	51.7
7	5.0410	5.236	51.9
8	5.0456	5.246	52.0
平均值	5.0460	5.245	52.0

Table 2. The absorbance of each point of vitamin C standard series

表 2. 维生素 C 标准系列各点吸光度的测量值

维生素 C 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光值 A				标准曲线拟合值
	测定值 1	测定值 2	测定值 3	平均值	
1.00	6.682	6.745	6.621	6.683	6.854
2.50	16.273	16.225	16.341	16.280	16.661
5.00	34.079	34.11	34.23	34.140	33.006
7.50	48.883	48.891	48.769	48.848	49.351
10.0	65.568	65.412	65.881	65.620	65.696

标准工作溶液共有 5 个梯度浓度, 每个浓度重复测定 3 次, 取平均值进行计算, 得到线性方程为 $A = 6.538c + 0.316$, $R^2 = 0.9992$, 在 $1.00 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 扣除空白后维生素 C 浓度与荧光强度线性关系良好, 选择一乳粉样品测量 8 次, 以吸光度平均值计算溶液中维生素 C 的浓度, 样品测定结果如表 1 所示。标准溶液系列具体测量结果如表 2 所示。拟合标准曲线引入的相对不确定度[8]:

$$S(A_r) = \sqrt{\frac{\sum (A_i - (a \times c + b))^2}{Mn - 2}} = \sqrt{\frac{1.71904}{5 \times 3 - 2}} = 0.363$$

式中: A_i 为标准溶液荧光强度; M 为标准溶液曲线浓度水平, $M = 5$; n 为每个浓度标准溶液重复测量次数, $n = 3$ 。

$$u(c) = \frac{S(Ar)}{c_0 \times k} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(c_0 - c_1)^2}{\sum (c_i - c_1)^2}} = \frac{0.363}{5.245 \times 6.538} \sqrt{\frac{1}{8} + \frac{1}{15} + \frac{(5.425 - 5.20)^2}{0.027691}} = 0.0150$$

式中： $s(Ar)$ 为标准曲线荧光强度的残差， $s(Ar) = 0.363$ ； k 为标准曲线的斜率， $k = 6.538$ ； c_0 为样品测定平均浓度， c_0 为 $5.425 \mu\text{g/mL}$ ； P 为样品溶液的测量次数， $P = 8$ ； N 为标准溶液总测量次数， $N = 5 \times 3 = 15$ ； c_1 为标准溶液平均浓度， c_1 为 $5.20 \mu\text{g/mL}$ 。

3.5. 样品前处理引入的不确定度 $u(p)$

3.5.1. 称量试样引入的不确定度分析 $u(pm)$

实验选取的天平允许的最大误差为 $\pm 0.1 \text{ mg}$ ，乳粉样品称取 5.00 g ，其称样误差按矩形分布计算，其相对标准不确定度为：

$$upm = \frac{a}{k} = \frac{0.0001}{5.00 \times \sqrt{3}} = 1.15 \times 10^{-5}$$

3.5.2. 样品处理引入的不确定度 $u(pV)$

样品前处理过程中样品溶液涉及 100 mL 容量瓶 1 次， 25 mL 容量瓶 1 次，移取 2 mL 移液管 1 次，移取 5 mL 移液管 1 次。根据《常用玻璃量器检定规程》(JJG 196-2006)规定， 50 mL (A 级)容量瓶体积允差为 $\pm 0.05 \text{ mL}$ ，其相对不确定度为 5.77×10^{-4} ； 100 mL (A 级)容量瓶体积允差为 $\pm 0.10 \text{ mL}$ ，其相对不确定度为 5.77×10^{-4} ； 2 mL 单标线移液管体积允差为 $\pm 0.010 \text{ mL}$ ，其相对不确定度为 2.89×10^{-4} ； 5 mL 单标线移液管体积允差为 $\pm 0.015 \text{ mL}$ ，其相对不确定度为 1.73×10^{-3} ；服从矩形分布。样品处理引入的不确定度为：

$$u(pV) = \sqrt{(0.00289)^2 + (0.00173)^2 + (0.000577)^2 + (0.000577)^2} = 3.46 \times 10^{-3}$$

3.5.3. 测量重复性引入的不确定度 $u(pR)$

同时称取 8 份乳粉样品，按照前处理方法处理样品，结果如表 1 所示，计算 8 次重复性结果和平均值。相对标准不确定度计算公式为：

$$u(pR) = \frac{S}{X \times \sqrt{n}} = \frac{0.3563}{52.0 \times \sqrt{8}} = 0.0242$$

式中： X 为平均值， $X = 52.0 \text{ g}/100\text{g}$ ； S 为重复性标准偏差， $S = 0.0.3563$ ； n 为重复测定次数， $n = 8$ 。

3.5.4. 前处理引入的合成相对不确定度 $u(p)$

$$\begin{aligned} u(p) &= \sqrt{(u(pm))^2 + (u(pV))^2 + (u(pR))^2} \\ &= \sqrt{(2.09 \times 10^{-3})^2 + (3.46 \times 10^{-3})^2 + (0.0242)^2} = 0.0244 \end{aligned}$$

3.6. 合成相对标准不确定度

对乳粉中维生素 C 测定过程中不确定度进行分析和计算，测定维生素 C 含量所引入的各不确定度分量 u_i 彼此独立，互不相关，合成相对标准不确定度公式：

$$\begin{aligned} u &= \sqrt{u(\text{cref})^2 + uc^2 + up^2} \\ &= \sqrt{(2.40 \times 10^{-3})^2 + (0.0150)^2 + (0.0244)^2} = 0.0286 \end{aligned}$$

3.7. 扩展不确定度评定

在 95% 的置信水平条件下, 根据相关测量不确定度评定与表示方式, 当 $k=2$, 样品中维生素 C 的含量为 52.0 mg/100g, 则扩展不确定度为: $U = 0.0286 \times 2 \times 52.0 = 3.0 \text{ mg/100mg}$, 按照该方法测定维生素 C 的测定结果报告为: $X = (52.0 \pm 3.0) \text{ mg/100mg}; k = 2$ 。

4. 结论

本文使用荧光分光光度计对乳粉中维生素 C 含量的不确定度进行了全要素的分析汇总, 检验结果的重复性测量和校准曲线的拟合因素是乳粉中维生素 C 含量的不确定度的主要来源。因此, 在实验过程中要规范操作步骤, 控制样品的数据平行性, 确保曲线拟合的准确性。在检验过程中保证标准曲线与样品的同步测定, 移取定容时要选择经过校准的器具, 减少人为误差的产生, 提高结果的精密度与准确性。

参考文献

- [1] 王霞, 张维谊, 韩奕奕, 等. 高效液相色谱法测定水果和蔬菜中维生素 C 含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 73-77.
- [2] 辛颖. 维 C 银翘片中维生素 C 含量测定的不确定度评定[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(8): 441-442.
- [3] 贾玉英, 李博静, 张彩霞, 等. 维生素 C 含量测量不确定度评定[J]. 河北化工, 2012, 35(5): 33-34+64.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 化学分析测量不确定度评定: JJF 1135-2005 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2005.
- [5] 中华人民共和国国家卫生部. 食品安全国家标准婴幼儿和乳品中国维生素 C 的测定: GB 5413.18-2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. 电子天平检定规程: JJG 1036-2008 [S]. 北京: 中国质检出版社, 2008.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. 常用玻璃量器检定规程: JJG 196-2006 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- [8] 都芸, 王开宇, 左惠君, 等. 分光光度法测定白酒中氰化物含量的不确定度评定[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 273-279.