

HPLC 法测定粮谷中赭曲霉毒素 A 含量 结果的不确定度评定

李万鹏¹, 弓丽华¹, 付爽²

(1. 河南广电量检测有限公司 食品实验室, 河南 郑州 450001;
2. 河南检验检疫鉴定咨询中心, 河南 郑州 450003)

摘要:通过建立 HPLC 法测定粮谷中赭曲霉毒素 A (OTA) 含量的不确定度评定方法, 计算测定过程中各分量的标准不确定度和扩展不确定度, 对测定结果的不确定度来源及相对贡献进行比较与评定. 结果表明: 测定结果的不确定度来源于校准不确定度、样品称量不确定度和体积不确定度、前处理过程样品回收率 (*Rec*) 不确定度和仪器测定过程中的不确定度, 其中, 校准不确定度中标准溶液配制不确定度的相对贡献最多, 体积不确定度最小; 当粮谷中 OTA 的含量为 3.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 其扩展不确定度为 0.476 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (包含因子 $k=2$). 因此, 检测人员应严格按照规范配制标准溶液, 同时把握好前处理过程中提取、净化、洗脱等步骤的关键控制点, 从而将测定结果的不确定度控制在可接受的范围内.

关键词: HPLC 法; 粮谷; 赭曲霉毒素 A; 不确定度

中图分类号: TS207.4; 065 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-476X.2015.3/4.005

Uncertainty evaluation in the determination result of ochratoxin A in cereal grains by HPLC

LI Wan-peng¹, GONG Li-hua¹, FU Shuang²

(1. Food Laboratory, He'nan GRG Metrology & Test Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China;

2. Consultancy Centre of He'nan Inspection & Quarantine Identification of P. R., Zhengzhou 450003, China)

Abstract: An evaluation method for uncertainty in measuring ochratoxin A (OTA) in cereal grains with HPLC was established. Standard uncertainty and expanded uncertainty of the components in the process of the determination were calculated, an evaluation and comparison on the sources of uncertainty and the relative contribution were made. The results showed that the sources of the determination result uncertainty could be attributed to uncertainty of calibration, weighting sample, volume, recovery and testing by instrument. Preparing standard solution of the uncertainty of calibration accounted for the largest proportion of the uncertainty, and the uncertainty of volume accounted for the minimum. The expanded uncertainty was 0.476 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (coverage factor $k=2$) when the content of OTA was 3.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in cereal grains. Therefore, testing personnel should prepare standard solution strictly in accordance with the specification, at the same time, hold good critical control points of pretreatment process steps such as extraction, purification,

收稿日期: 2015-04-14

作者简介: 李万鹏(1983—), 男, 河南省郑州市人, 河南广电量检测有限公司助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全.

elution and so on, in order to control the uncertainty of the determination results in an acceptable range.

Key words: HPLC; cereal grains; ochratoxin A (OTA); uncertainty

0 引言

赭曲霉毒素是一组主要污染食品的真菌毒素,其中,赭曲霉毒素 A (OTA) 对农产品的污染最严重,毒量高、毒性大、分布广泛,具有致癌、致突变和免疫抑制作用,对人类、动物的肝和肾脏的毒性最大。GB 2761—2011^[1] 中规定,在谷物及其制品中 OTA 的限量为 5.0 μg/kg。因此,准确测定粮谷中 OTA 的含量非常重要。

不确定度是合理表征、赋予被测量值的分散性与测量结果相联系的参数,是科学评价检测结果的参数之一^[2]。陈荔红等^[3-6] 曾对乳粉、肉类和姜等食品中不同参数的测定进行不确定度评定,发现不确定度的主要来源是测量重复性、回收率 (Rec) 和体积等。本文拟采用 HPLC 法,并依据 GB/T 23502—2009^[7] 测定 OTA 在粮谷中的含量,参照 CNAS GL06—2006^[2], JJF 1059—1999^[8] 和 M. Robertson 等^[9-10] 对不确定度的研究,通过分析和量化各不确定度分量对测定结果的影响,计算被测量物质的标准不确定度和扩展不确定度,分析不确定度分量对测定结果不确定度的相对贡献,以期对评价测定结果的准确性和可靠性提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:OTA 标准物质(纯度 99.9%),美国 O2si Smart Solutions 产;甲醇(分析纯),西陇化工股份有限公司产;氯化钠、碳酸氢钠,均为分析纯,天津市致远化学试剂有限公司产;吐温-20(分析纯),阿拉丁试剂(上海)有限公司产。缓冲液配制:称取 25.0 g 氯化钠和 5.0 g 碳酸氢钠溶于水中,加入 0.1 mL 吐温-20,用水稀释至 1 L。

主要仪器:ME204E/02 电子天平(感量 0.1 mg),美国梅特勒-托利多公司产;e2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产;Sunfire C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),美国 Waters 公司产;OTA 免疫亲和柱,美国 Beacon 公司产;Silent Crusier M 高速均质器,德国海道夫公司产。

1.2 实验方法

参照 GB/T 23502—2009 免疫亲和柱净化高效

液相色谱法进行。

1.2.1 实验步骤 首先用乙腈水溶液提取样品中的 OTA,得到 OTA 提取液,再用含有 OTA 特异性抗体的免疫亲和柱净化提取液(利用抗体与相应抗原之间的免疫亲和反应),最后用高效液相色谱仪(配有荧光检测器)确证,外标法定量。

1.2.2 测定过程 称取已粉碎的粮谷 20 g(精确至 0.01 g)于 100 mL 容量瓶中,加入 5 g 氯化钠,用甲醇-水($v:v=4:1$)溶液定容至刻度,涡旋混合振荡 1 min 后,转移至均质器中,8 000 r/min 匀浆混合提取 2 min,经离心得到上清液后,准确移取 10.0 mL 于 50 mL 容量瓶中,加水定容,混合均匀,经玻璃纤维滤纸过滤后备用。

在 10 mL 玻璃注射器上端连接 OTA 免疫亲和柱,准确吸取 10.0 mL 上述备用液于玻璃注射器中,调节压力,使溶液通过 OTA 免疫亲和柱的流速保持在约 1 滴/s,直至有空气进入亲和柱中。再分别用 10 mL 缓冲液、10 mL 水依次淋洗免疫亲和柱,弃去流出液,抽干小柱。用 1.0 mL 甲醇洗脱 OTA,收集全部洗脱液于玻璃试管中,用甲醇定容至 1.0 mL, HPLC 法测定。

1.2.3 色谱条件 流动相:乙腈+水+冰乙酸(体积份数 99+99+2);柱温:室温;进样量 20 μL;流速 1.0 mL/min;荧光检测器:激发波长 333 nm,发射波长 477 nm。

1.2.4 定量方法 用浓度为(10.03 ± 0.86) mg/L 的标准储备液逐级稀释,配成浓度分别为 50 μg/L, 10 μg/L, 5 μg/L, 2.5 μg/L, 1 μg/L 的系列标准工作溶液,5 种不同浓度的标准工作液均用 HPLC 法重复测定 3 次,取平均值,标准工作曲线用最小二乘法拟合进行校准得到浓度-峰面积曲线。

1.2.5 OTA 含量的计算公式 按照下式计算 OTA 的含量。

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 1\,000 \times f}{m \times 1\,000 \times Rec} \times f_{ref}$$

式中, X 表示样品中 OTA 的含量/(μg · kg⁻¹), c 表示提取样品中 OTA 最终定容 1 mL 甲醇溶液中 OTA 的浓度/(ng · mL⁻¹), c_0 表示提取空白样品中 OTA 最终定容 1 mL 甲醇溶液中 OTA 的浓度/(ng · mL⁻¹), V 表示样品提取 OTA 后最终的定容体积/

mL, f 表示样品稀释倍数, m 表示样品的称样量/g, f_{rel} 表示重复性因子.

2 结果与讨论

2.1 不确定度来源分析

对不确定度因素的分析见图 1. 结合图 1, 从检测原理、方法及 OTA 含量计算公式到溶液的配制、仪器的使用来看, 可以认定 OTA 检测结果的不确定度主要来源于校准不确定度、样品称量不确定度、体积不确定度、前处理过程样品 Rec 的不确定度、随机效应带入的不确定度等.

2.2 不确定度分量的评定

2.2.1 校准不确定度 校准过程中的不确定度包含两种不确定因素: 一是标准溶液配制的不确定度, 二是计算样品中 OTA 浓度时带入的不确定度.

2.2.1.1 标准溶液配制的不确定度

1) 标准物质的不确定度: 不同厂家生产的标准物质的纯度不同, 由其所导致的不确定度也不同, 查找 OTA 标准物质的出厂证书可以知道其浓度为 (10.03 ± 0.86) mg/L, 置信水平为 95%, 不确定度为正态分布, 故其标准不确定度(u)和相对标准不确定度(u_{rel})分别为

$$u(c_s) = \frac{0.86}{1.96} \text{ mg/L} = 0.44 \text{ mg/L}$$

$$u_{rel}(c_s) = \frac{u(c_s)}{c_s} = \frac{0.44}{10.03} = 0.044$$

2) 中间标准溶液配制的不确定度: 在配制中间标准溶液时, 准确吸取浓度为 (10.03 ± 0.86) mg/L

的 OTA 标准储备溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到浓度为 $1.00 \mu\text{g/mL}$ 的中间标准溶液. 配制过程中使用移液器吸取标准储备液时, 会引入一定的不确定度, 依据 JJG 646—2006 移液器检定规程^[11]中相应的最大允差(MPE), 并根据矩形分布计算可以得到 $u(V_1)$ 和 $u_{rel}(V_1)$ 分别为

$$u(V_1) = \frac{1 \times 1\%}{\sqrt{3}} \text{ mL} = 0.00577 \text{ mL}$$

$$u_{rel}(V_1) = \frac{u(V_1)}{V_1} = \frac{0.00577}{1} = 0.0058$$

同样可以根据 JJG 196—2006 规程^[12]得到, 配制过程中使用的 10 mL 容量瓶的允差为 ± 0.020 mL, $u(V_2)$ 和 $u_{rel}(V_2)$ 分别为

$$u(V_2) = \frac{0.020}{\sqrt{3}} \text{ mL} = 0.0115 \text{ mL}$$

$$u_{rel}(V_2) = \frac{u(V_2)}{V_2} = \frac{0.0115}{10} = 0.0012$$

3) 标准工作液配制的不确定度: 标准工作液由 $1.00 \mu\text{g/mL}$ 的中间标准溶液经逐级稀释, 分别配成浓度为 $50 \mu\text{g/L}$, $10 \mu\text{g/L}$, $5 \mu\text{g/L}$, $2.5 \mu\text{g/L}$, $1 \mu\text{g/L}$ 的标准工作液. 配制过程中使用了大小不同的移液器, 由此产生的不确定度如表 1 所示, 依据 JJG 646—2006 移液器检定规程中相应的 MPE, 计算得到

$$u_{rel}(V_s) = \sqrt{u_1^2 + 2 \times u_2^2 + u_3^2 + 5 \times u_4^2 + \dots + u_5^2} = 0.048$$

综上所述, 标准溶液配制带入的不确定度为

$$u_{rel}(ref) =$$

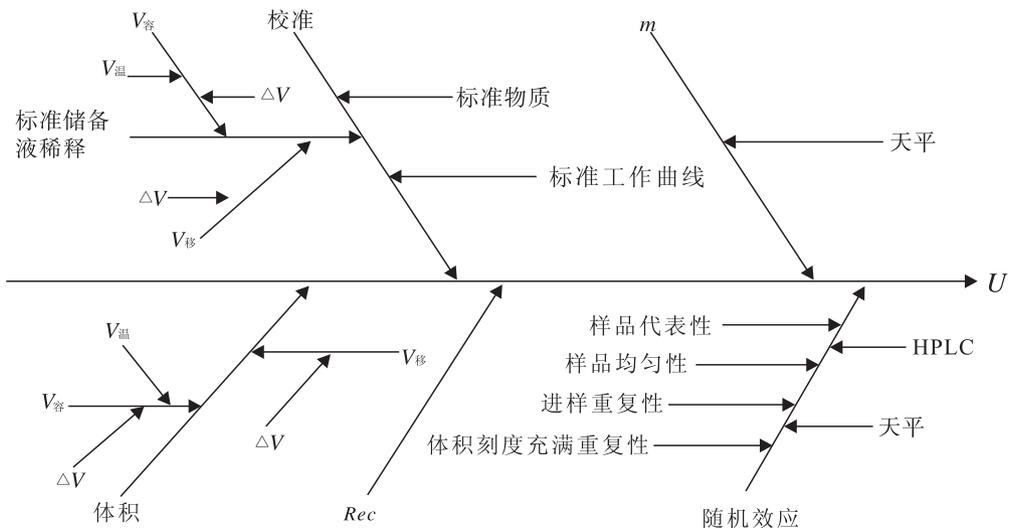


图 1 不确定度因素的分析图

$$\sqrt{u_{\text{rel}}^2(c_s) + u_{\text{rel}}^2(V_1) + u_{\text{rel}}^2(V_2) + u_{\text{rel}}^2(V_3)} = \sqrt{0.044^2 + 0.0058^2 + 0.0012^2 + 0.048^2} = 0.0654$$

2.2.1.2 计算样品中 OTA 浓度带入的不确定度

样品中 OTA 浓度测定过程采用所配制的 50 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 2.5 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液, 每个浓度分别测定 3 次, 得到 3 次对应的峰面积 A_1 — A_3 , 根据最小二乘法计算, 拟合求得标准工作曲线的一元一次方程 $A = 895\ 158C - 224\ 677$, 结果见表 2。

将得到的 3 次样品峰面积值 ($A_1 = 8\ 951\ 273$, $A_2 = 8\ 866\ 347$, $A_3 = 9\ 125\ 334$) 代入标准曲线方程中, 求得 3 次测定的平均浓度 $C = 10.29\ \mu\text{g/L}$, 样品中 OTA 的浓度根据标准曲线求得, 而标准曲线的拟合过程中存在着一定的不确定度, 其 $u(c)$ 值为

$$u(c) = \frac{s(A)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c - \bar{c}_s)^2}{S_{CC}}} =$$

$$\frac{186\ 956.0}{895\ 158} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{15} + \frac{(10.29 - 13.7)^2}{1\ 693.80}} = 0.133$$

式中, $s(A)$ 表示标准溶液峰面积残差的标准差,

$$s(A) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (a + bC_j)]^2}{n-2}} = 186\ 956.0; A \text{ 表示}$$

标准溶液平均峰面积; C 表示标准溶液浓度; \bar{c}_s 表示标准溶液的平均浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$; S_{CC} 表示标准溶液浓度残差的平方和, $S_{CC} = \sum_{j=1}^n (c_{sj} - \bar{c}_s)^2 =$

1 693.80; n 表示标准溶液的测定次数, 本实验取 $n = 15$; p 表示试样的测定次数, 本实验取 $p = 3$ 。

标准曲线的拟合过程中存在的 $u_{\text{rel}}(c)$ 值为

$$u_{\text{rel}}(c) = \frac{u(c)}{c} = \frac{0.133}{10.29} = 0.0129$$

综上所述, 校准过程带入的不确定度为

$$u_{\text{rel}}(\text{cal}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(\text{ref}) + u_{\text{rel}}^2(c)} = \sqrt{0.0654^2 + 0.0129^2} = 0.0667$$

2.2.2 样品称量不确定度 称量样品时使用了电子天平, 而其本身就存在着一定的不确定度, 通过查电子天平的检定证书, 知其 $MPE = \pm 0.5\ \text{mg}$, 进而计算得到 $u(m)$ 和 $u_{\text{rel}}(m)$ 分别为

$$u(m) = \frac{0.5}{\sqrt{3}}\ \text{mg} = 0.289\ \text{mg}$$

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.289}{20 \times 1\ 000} = 0.000\ 014\ 45$$

2.2.3 体积不确定度

2.2.3.1 配制过程中容量瓶的不确定度 称取 20 g 样品于 100 mL 容量瓶中, 并定容至刻度, 根据 JJG 196—2006 规程, 配制过程中使用到的 100 mL A 级容量瓶的 $MPE = \pm 0.10\ \text{mL}$, 计算可以得到 $u(V_3)$ 和 $u_{\text{rel}}(V_3)$ 分别为

$$u(V_3) = \frac{0.10}{\sqrt{3}}\ \text{mL} = 0.0577\ \text{mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_3) = \frac{u(V_3)}{V_3} = \frac{0.0577}{100} = 0.000\ 58$$

准确移取均质离心后的上清液 10 mL 定容至 50 mL 容量瓶中, 根据 JJG 196—2006 规程, 使用到

表 1 使用不同量程移液器时的不确定度

移液器 量程/mL	吸取标液 体积/mL	MPE(移 液器)/%	u (移 液器)/mL	u_{rel} (移液器)	定容总 体积/mL	定容所需 移液/mL	MPE(1 mL 移液器)/%	u (1 mL 移液器)/mL	u_{rel} (1 mL 移液器)
0.1	0.05	3.0	0.001 73	$u_1 = 0.035$	1	0.95	1.0	0.005 77	$u_2 = 0.005 8$
0.2	0.2	1.5	0.001 73	$u_3 = 0.008 6$	1	0.8	1.0	0.005 77	$u_2 = 0.005 8$
1.0	0.5	1.0	0.005 77	$u_4 = 0.012$	1	0.5	1.0	0.005 77	$u_4 = 0.012$
1.0	0.5	1.0	0.005 77	$u_4 = 0.012$	1	0.5	1.0	0.005 77	$u_4 = 0.012$
1.0	0.4	1.0	0.005 77	$u_5 = 0.014$	1	0.6	1.0	0.005 77	$u_4 = 0.012$

表 2 标准工作液测定结果和标准曲线方程

标准溶液浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	峰面积			
	A_1	A_2	A_3	平均值
1	855 534	890 681	810 756	852 324
2.5	2 181 316	2 361 891	1 937 229	2 160 145
5	4 282 312	4 176 233	4 119 835	4 192 793
10	8 361 874	8 686 357	8 137 591	8 395 274
50	42 325 761	46 887 593	44 569 804	44 594 386
拟合结果	$A = 895\ 158C - 224\ 677$	$R^2 = 0.999$	截距 $a = -224\ 677$	斜率 $b = 895\ 158$

的 50 mL 的容量瓶的 $MPE = \pm 0.05$ mL, 计算得到 $u(V_4)$ 和 $r_{\text{rel}}(V_4)$ 分别为

$$u(V_4) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} \text{ mL} = 0.0289 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_4) = \frac{u(V_4)}{V_4} = \frac{0.0289}{50} = 0.00058$$

洗脱后, 用甲醇定容至 1 mL 容量瓶中, 根据 JJG 196—2006 规程, 1 mL 容量瓶的 $MPE = \pm 0.010$ mL, 计算得到 $u(V_5)$ 和 $u_{\text{rel}}(V_5)$ 分别为

$$u(V_5) = \frac{0.010}{\sqrt{3}} \text{ mL} = 0.00578 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_5) = \frac{u(V_5)}{V_5} = \frac{0.00578}{1} = 0.0058$$

2.2.3.2 移液器的不确定度 测定过程中移取样品提取液 10.0 mL 两次. 根据 JJG 646—2006 规程, 10 mL 移液器的 $MPE = \pm 0.6\%$, 计算得到 $u(V_6)$ 和 $u_{\text{rel}}(V_6)$ 分别为

$$u(V_6) = \frac{10 \times 0.6\%}{\sqrt{3}} \text{ mL} = 0.0346 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_6) = \frac{u(V_6)}{V_6} = \frac{0.0346}{10} = 0.0035$$

2.2.3.3 温度效应的不确定度

1) 由温度效应造成的 100 mL 容量瓶的不确定度. 实验处理过程的温度条件一般为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 此时温度所造成的 100 mL 容量瓶的体积变化为

$$V_{\text{temp}100} = 100 \times 5 \times 3.3 \times 10^{-6} \text{ mL} = 0.00165 \text{ mL}$$

式中, 3.3×10^{-6} 为玻璃的热膨胀系数/ $^\circ\text{C}^{-1}$.

同样可以根据矩形分布计算求得 $u(V_{\text{temp}100})$ 和 $u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}100})$ 分别为

$$u(V_{\text{temp}100}) = \frac{0.00165}{\sqrt{3}} \text{ mL} = 0.000953 \text{ mL}$$

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}100}) = \frac{u(V_{\text{temp}100})}{V_{100}} = \frac{0.000953}{100} = 0.0000095$$

2) 由温度效应造成的 50 mL, 10 mL, 1 mL 容量瓶的不确定度. 按照 $u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}100})$ 的计算方法得到:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}50}) = \frac{u(V_{\text{temp}50})}{V_{50}} = \frac{0.000476}{50} = 0.0000095$$

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}10}) = \frac{u(V_{\text{temp}10})}{V_{10}} = \frac{0.0000953}{10} = 0.0000095$$

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}1}) = \frac{u(V_{\text{temp}1})}{V_1} = \frac{0.00000953}{1} = 0.0000095$$

由此得到温度效应带入的不确定度为①.

综上所述, 体积不确定度是由配制过程中容量瓶的不确定度、移液器的不确定度和温度效应带入的不确定度带来的, 由此计算得到体积不确定度为②.

2.2.4 前处理过程样品 Rec 的不确定度 取一份确定不含有待测物质 OTA 的样品(阴性基质样品), 处理前加入一定量的 OTA, 处理后可以得到 OTA 的测定值, 经计算可以得到 Rec, 称取 6 份阴性基质样品, 分别加入相同量 5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 OTA 进行平行加标测定, 测定的 Rec 分别为 88.2%, 91.6%, 81.2%, 82.8%, 91.4%, 87.2%, 平均回收率 $\bar{R} = 87.1\%$, 标准偏差 $S_R = 4.31\%$, 计算得到 $u(\bar{R})$ 和 $u_{\text{rel}}(\bar{R})$ 分别为

$$u(\bar{R}) = \frac{S_R}{\sqrt{n}} = \frac{4.31\%}{\sqrt{6}} = 0.0176$$

$$u_{\text{rel}}(\bar{R}) = \frac{u(\bar{R})}{\bar{R}} = \frac{0.0176}{87.1\%} = 0.0202$$

2.2.5 随机效应带入的不确定度 按照 GB/T 23502—2009 测定阳性粮谷中 OTA 含量, 结果分别为 3.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均值 $\bar{\omega} = 3.17 \mu\text{g}/\text{kg}$, 标准偏差 $S(\bar{\omega}) = 0.015 \mu\text{g}/\text{kg}$, 计算测定过程中伴随的随机效应导致的 $u(\bar{\omega})$ 和 $u_{\text{rel}}(\bar{\omega})$ 分别为

$$u(\bar{\omega}) = \frac{S(\bar{\omega})}{\sqrt{n}} = \frac{0.151}{\sqrt{3}} \mu\text{g}/\text{kg} = 0.0872 \mu\text{g}/\text{kg}$$

$$u_{\text{rel}}(\bar{\omega}) = \frac{u(\bar{\omega})}{\bar{\omega}} = \frac{0.0872}{3.17} = 0.0275$$

2.3 主要不确定度分量对不确定度的贡献

表 3 为主要不确定度分量对不确定度的相对贡献. 由表 3 可知, 标准溶液配制的不确定度的相对贡献占绝大部分, 随机效应次之, 体积的影响相对较小, 因此, 在测量的过程中要严格控制标准溶液的配制.

$$\textcircled{1} \quad u_{\text{rel}}(V_{\text{temp}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_{\text{temp}100}) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{temp}50}) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{temp}10}) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{temp}1})} = 0.000019$$

$$\textcircled{2} \quad u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_3) + u_{\text{rel}}^2(V_4) + u_{\text{rel}}^2(V_5) + 2 \times u_{\text{rel}}^2(V_6) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{temp}})} = \sqrt{0.00058^2 + 0.00058^2 + 0.0058^2 + 2 \times 0.0035^2 + 0.000019^2} = 0.00683$$

表3 主要不确定度分量的相对贡献

不确定度分量	相对标准不确定度 $u(y_i)$	相对贡献 $[u(y_i)/u(y)]^2/\%$
标准溶液配制影响	0.065 40	75.63
校准曲线拟合影响	0.012 90	2.94
体积的影响	0.006 83	0.82
样品前处理 Rec	0.020 20	7.22
随机效应的影响	0.027 50	13.37

2.4 合成不确定度

测定样品中 OTA 含量结果中

$$u_{c,rel}(\bar{\omega}) =$$

$$\frac{\sqrt{u_{rel}^2(cal) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(\bar{R}) + u_{rel}^2(\bar{\omega})}}{\sqrt{0.066^2 + 0.000\ 014\ 45^2 + 0.006\ 83^2 + 0.020\ 2^2 + 0.027\ 5^2}} = 0.075\ 2$$

2.5 扩展不确定度

本实验粮谷中 OTA 的含量为 $3.17\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 则其标准不确定度

$$u_c(\bar{\omega}) = \bar{\omega} \times u_{c,rel}(\bar{\omega}) = 3.17 \times 0.075\ 2 = 0.238\ \mu\text{g}/\text{kg}$$

在没有特殊要求的情况下, 按照国际惯例, 取扩展因子 $k=2$, 置信概率 $p=95\%$, 则 OTA 测量结果的相对扩展不确定度

$$U = k \times u_c(\bar{\omega}) = 2 \times 0.238 = 0.476\ \mu\text{g}/\text{kg}$$

3 结论

本文采用 HPLC 法测定粮谷中 OTA 的含量, 通过分析和量化各分量不确定度对测定结果的影响, 计算得出各分量的标准不确定度和扩展不确定度, 并对测定结果的不确定度来源及各分量相对贡献进行比较和评定, 得到如下结论: 1) 测量结果的不确定度主要来源于标准溶液的配制, 其次是随机效应、样品前处理 Rec 和校准曲线拟合, 体积的影响最

小; 2) 实验结果的不确定度可表示为 $(3.17 \pm 0.476)\ \mu\text{g}/\text{kg}$. 因此, 在测定过程中, 检测人员应严格按照规范配制标准溶液, 减小定容和移液过程中产生的不确定度; 同时, 还应把握好前处理过程中提取、净化、洗脱等步骤的关键控制点. 只有这样, 才能把不确定度控制在可接受的范围内.

参考文献:

- [1] GB 2761—2011, 食品安全国家标准·食品中真菌毒素限量[S].
- [2] CNAS GL06—2006, 化学分析中不确定度的评估指南[S].
- [3] 陈荔红. 高效液相色谱法测定全脂乳粉中苯甲酸含量的测定不确定度评定[J]. 质量技术监督研究, 2011(5): 27.
- [4] 常晨阳, 王碧生, 方成俊, 等. LC-MS/MS 法测定动物源食品中呋喃西林代谢物不确定度的评定[J]. 现代农业科技, 2014(12): 274.
- [5] 钟帼歌, 富志军. LC-MS 法测定猪肉中喹诺酮类药物残留的不确定度评定[J]. 海峡药学, 2014, 26(2): 63.
- [6] 倪永付, 闫秋成, 朱莉萍, 等. LC-MS/MS 法测定鲜姜中涕灭威及其代谢物的不确定度评定[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(23): 95.
- [7] GB/T 23502—2009, 食品中赭曲霉毒素 A 的测定·免疫亲和层析净化高效液相色谱法[S].
- [8] JJF 1059—1999, 测量不确定度评定与表示[S].
- [9] Robertson M, Chan T S S. APLAC interpretation and guidance on the estimation of uncertainty of measurement in testing[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(5): 1070.
- [10] Kuang Y C, Rajan A, Ooi M P L, et al. Standard uncertainty evaluation of multivariate polynomial[J]. Measurement, 2014, 58: 483.
- [11] JJG 646—2006, 移液器检定规程[S].
- [12] JJG 196—2006, 常用玻璃量器检定规程[S].