

高效液相色谱法测定酱菜中脱氢乙酸含量的不确定度评定

邢蕊¹, 胡宗武^{2*}, 梁笑天¹, 董蔚¹, 漆倩涯¹

(1.兰州中检科测试技术有限公司, 兰州 730070; 2.兰州理工大学 石油化工学院, 兰州 730050)

摘要:采用高效液相色谱法测定酱菜中脱氢乙酸的含量,建立数学模型,分析不确定度来源,并对测定结果的不确定度进行了计算和评定,得出样品中脱氢乙酸的含量为0.122 g/kg,其扩展不确定度为0.003 g/kg, $k=2$ 。评定结果表明:对检测结果不确定度影响最大的是由标准曲线拟合求得的浓度,其次是测定的重复性。因此,在实验过程中操作人员应严格按照操作规程,检查分析影响因素,减小这些不确定度分量,从而提高测量结果的准确性。

关键词:不确定度;脱氢乙酸;高效液相色谱;酱菜

中图分类号:TS255.53

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1000-9973.2021.10.031

文章编号:1000-9973(2021)10-0160-04

Evaluation of Uncertainty for Determination of Dehydroacetic Acid Content in Pickles by High Performance Liquid Chromatography

XING Rui¹, HU Zong-wu^{2*}, LIANG Xiao-tian¹, DONG Wei¹, QI Qian-ya¹

(1.Lanzhou Testing Technology Co., Ltd. of Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Lanzhou 730070, China; 2.College of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The determination of dehydroacetic acid in pickles by high performance liquid chromatography is carried out. The mathematical model is established to analyze the source of uncertainty. The uncertainty of the determination results is calculated and evaluated. The content of dehydroacetic acid in the sample is 0.122 g/kg, the expanded uncertainty is 0.003 g/kg, $k=2$. The results show that the concentration obtained by standard curve fitting has the greatest influence on the uncertainty of test results, followed by the testing repeatability. Therefore, in the process of experiment, operators should strictly follow the operating procedures, check and analyze the influencing factors, reduce these uncertainty components, so as to improve the accuracy of determination results.

Key words: uncertainty; dehydroacetic acid; high performance liquid chromatography; pickles

酱菜是将新鲜的蔬菜经腌渍、微生物发酵或酱渍加工而成的各种蔬菜制品^[1],因味道鲜美、营养丰富而深受人们的喜爱,逐渐成为人们饭桌上不可或缺的调味副食品^[2-3]。脱氢乙酸是一种低毒高效的食品防腐剂^[4-5],常用于面包、糕点、果蔬汁、发酵豆制品、腌渍的蔬菜等食品中^[6]。但是大量地使用脱氢乙酸将会影响人体的肾脏、肝脏^[7],甚至可能引发癌症^[8],同时GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[9]中也明确指出了脱氢乙酸在一些食品中的最大使用量,其中在腌渍的蔬菜中脱氢乙酸的最大使用

量为1.0 g/kg^[10]。因此,我们对食品中脱氢乙酸的使用进行日常监管及对检测结果的准确性判断显得尤为重要^[11]。

本实验依据GB 5009.121-2016《食品安全国家标准 食品中脱氢乙酸的测定》^[12]、JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[13]和CNAS-GL006-2019《化学分析中不确定度的评估指南》^[14]中规定的基本方法和程序,采用高效液相色谱法对酱菜中脱氢乙酸的含量进行了测定,分析酱菜中脱氢乙酸含量的不确定度来源,并对其测定结果的不确定度进行了计算和评定,从而为酱

收稿日期:2021-04-16

基金项目:甘肃省青年科技基金计划项目(20JR10RA571)

作者简介:邢蕊(1990-),女,甘肃会宁人,工程师,硕士,研究方向:食品安全检测。

*通讯作者:胡宗武(1989-),男,甘肃会宁人,讲师,硕士,研究方向:化工安全。

引文格式:邢蕊,胡宗武,梁笑天,等.高效液相色谱法测定酱菜中脱氢乙酸含量的不确定度评定[J].中国调味品,2021,46(10):160-163.

菜中脱氢乙酸含量测定方法的可行性和准确性提供了参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

酱菜:市售;脱氢乙酸标准品:批号 B0003452,纯度 99.9%,北京曼哈格生物科技有限公司;乙酸铵:色谱纯,Aladdin 公司;甲醇:色谱纯:HiPure Chem 公司;硫酸锌和氢氧化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器) 日本岛津公司;ME204E 电子天平 梅特勒-托利多公司;KQ-500DE 超声波清洗器 昆山超声仪器有限公司;LD5-2B 离心机 北京雷勃尔离心机有限公司。

1.3 实验方法

参照 GB 5009.121-2016《食品安全国家标准 食品中脱氢乙酸的测定》第二法液相色谱法。

1.3.1 标准溶液配制

准确称取脱氢乙酸标准品 10 mg,用 1 mL 氢氧化钠溶液(20 g/L)溶解在 10 mL 容量瓶中,用水定容,配制成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的标准贮备液。分别吸取脱氢乙酸贮备液 0.005,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2 mL 于 10 mL 容量瓶中,用水定容,配制成 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。

1.3.2 样品前处理

称取已粉碎的试样 2 g,置于 50 mL 离心管中,加入约 10 mL 水,5 mL 硫酸锌溶液(120 g/L),用氢氧化钠溶液(20 g/L)调 pH 至 7.5,转移至 25 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。置于离心管中,超声提取 10 min,4000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 有机滤膜,供高效液相色谱测定。

1.3.3 色谱条件

色谱柱 ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm \times 5.0 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇+0.02 mol/L 乙酸铵溶液(10+90,体积比);流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL ;检测波长:293 nm。

1.4 数学模型的建立

样品中脱氢乙酸含量的计算公式为:

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000}$$

式中: X 为样品中脱氢乙酸的含量, g/kg ; C 为样品溶液中脱氢乙酸的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; C_0 为空白样品溶液中脱氢乙酸的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V 为样品溶液总体积, mL; m 为样品的质量, g。

2 结果与分析

2.1 不确定度来源分析

根据实验方法所建立的数学模型并结合相关信息,分析影响测定结果的不确定度,其主要来源于样品的称量、样品溶液的定容、标准溶液的配制、容量瓶的校准、标准曲线的拟合、样品的重复性分析等过程。

通过分析以上各不确定度分量,并合成相对标准不确定度。在 95% 的置信水平下,得到扩展不确定度,最终量化高效液相色谱法测定酱菜中脱氢乙酸含量的不确定度。

2.2 不确定度各分量的评定

2.2.1 样品称量过程中引入的不确定度

称量过程的重复性和天平的准确性是样品称量过程中不确定度的主要来源,其中样品称量过程中的重复性所引入的不确定度分量已包含在各种因素造成的重复性影响修正值不确定度分量中。

根据电子天平的检定证书,天平的分辨率为 0.1 mg,称样量 $m \leq 50$ g 时,最大允许误差为 ± 0.5 mg,称取样品 2 g,按均匀分布,则不确定度为:

$$u_1(m) = \frac{0.1/2}{\sqrt{3}} = 0.0289 \text{ mg},$$

$$u_2(m) = \frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.289 \text{ mg}。$$

则称重的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(m) = \frac{\sqrt{u_1(m)^2 + u_2(m)^2}}{2 \times 1000} = 0.000145。$$

2.2.2 样品定容过程中引入的不确定度

样品定容过程中的不确定度主要是容量瓶的准确性和温度变化两个方面引入的。

2.2.2.1 容量瓶的准确性引入的不确定度

经计量校准,本次实验所用的 25 mL 容量瓶合格,根据校准证书可得其容量的允许误差为 ± 0.03 mL,按均匀分布,则相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(V_1) = \frac{0.03}{25 \times \sqrt{3}} = 0.000693。$$

2.2.2.2 温度变化引入的不确定度

玻璃器具出厂校准温度与实验室使用温度的差异是温度变化引入的不确定度,已知玻璃器具的校准温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,本实验室实际使用温度变化范围为 ± 3 $^{\circ}\text{C}$,水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}\text{C}$,则不确定度分量为:

$$U_{rel}(T_1) = \frac{25 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4}}{25 \times \sqrt{3}} = 0.000364。$$

2.2.2.3 定容过程中引入的相对标准不确定度

$$U_{rel}(V) = \sqrt{U_{rel}(V_1)^2 + U_{rel}(T_1)^2} = 0.000783。$$

2.2.3 由标准曲线求得结果引入的不确定度

脱氢乙酸标准物质的纯度、标准溶液的配制过程和拟合标准曲线非线性所引入的不确定度是标准曲线求得结果引入的不确定度主要来源。

2.2.3.1 脱氢乙酸标准物质纯度引入的不确定度

由标准物质证书可知,本实验所用的脱氢乙酸标准物质的纯度为 99.9%,其相对扩展不确定度为 2%, $k=2$,则标准物质引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(\text{std}) = \frac{2\%}{2} = 0.01。$$

2.2.3.2 标准溶液配制过程中称量标准物质引入的不确定度

由本实验所用电子天平的检定证书可知,天平的分辨率为 0.01 mg,称样量 $m \leq 5$ g 时,最大允许误差为 ± 0.05 mg,称取标品 9.68 mg,按均匀分布,则不确定度为:

$$u_1(w) = \frac{0.01/2}{\sqrt{3}} = 0.00289 \text{ mg},$$

$$u_2(w) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289 \text{ mg}。$$

则标准品称量的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(w) = \frac{\sqrt{u_1(w)^2 + u_2(w)^2}}{9.68} = 0.00300。$$

2.2.3.3 标准溶液配制过程中所用容量瓶准确性引入的不确定度

本实验采用 10 mL A 级容量瓶配制标准溶液,其允许误差为 ± 0.020 mL,假设为均匀分布,则相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(V_2) = \frac{0.020}{10 \times \sqrt{3}} = 0.00115。$$

2.2.3.4 标准溶液配制过程中温度变化引入的不确定度

水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$,本实验室使用温度与校准温度变化范围为 ± 3 $^\circ\text{C}$,则不确定度分量为:

$$U_{rel}(T_2) = \frac{10 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4}}{10 \times \sqrt{3}} = 0.000364。$$

2.2.3.5 标准曲线的拟合引入的不确定度

本实验采用 6 个浓度水平点的脱氢乙酸标准溶液,每一浓度点测定 2 次,测定结果见表 1。

表 1 脱氢乙酸的标准曲线测定结果

Table 1 The determination results of standard curves of dehydroacetic acid

浓度 C /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	峰面积 Y_1 /($\text{mAU} \cdot \text{s}$)	峰面积 Y_2 /($\text{mAU} \cdot \text{s}$)	峰面积平均值 Y /($\text{mAU} \cdot \text{s}$)	线性方程
0.5	7605	7046	7326	$y = 21766.43x - 4023.28$
1.0	16832	17395	17114	
2.0	37011	37577	37294	
5.0	104044	103271	103658	
10.0	219381	219902	219642	
20.0	430608	427060	428834	

本实验对样品测定液进行了 6 次测定,由直线方程求得各次测量值,计算其平均质量浓度为 $C = 9.834 \mu\text{g}/\text{mL}$,其相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(q) = \frac{S_R}{C \times B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}}。$$

式中: S_R 为标准溶液峰面积的标准偏差, $S_R =$

$$\sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n [Y_i - (B_1 C_i + B_0)]^2} = 3242.302; C \text{ 为样品溶液的平均质量浓度 } (\mu\text{g}/\text{mL}), C = 9.834 \mu\text{g}/\text{mL}; B_1 \text{ 为工作曲线的斜率}, B_1 = 21766.43; P \text{ 为样品平行测定次数}, P = 6; n \text{ 为标准溶液测定次数}, n = 2 \times 6 = 12; \bar{C} \text{ 为标准系列溶液的平均质量浓度 } (\mu\text{g}/\text{mL}), \bar{C} = 6.417 \mu\text{g}/\text{mL}; C_i \text{ 为标准溶液的质量浓度 } (\mu\text{g}/\text{mL}), \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 = 566.417。$$

将以上各计算值带入公式,得标准曲线拟合的不确定度:

$$U_{rel}(q) = \frac{3242.302}{9.834 \times 21766.43} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{12} + \frac{(9.834 - 6.417)^2}{566.417}} = 0.00788。$$

即得由标准曲线求得结果引入的合成相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(C) = \sqrt{U_{rel}(\text{std})^2 + U_{rel}(w)^2 + U_{rel}(V_2)^2 + U_{rel}(T_2)^2 + U_{rel}(q)^2} = 0.0131。$$

2.2.4 各种因素造成的重复性引入的不确定度

在整个处理过程中,因样品前处理的不确定度有温度、时间、加入试剂的量、提取效率、容器附着的量等引入的不确定度分量,可通过平行测定来评估不确定度分量。

在重复性条件下,对样品进行了 6 次独立测试,脱氢乙酸含量分别是 0.122, 0.123, 0.123, 0.121, 0.122, 0.123 g/kg, 则脱氢乙酸含量的平均值为 0.122 g/kg, 则样品测试的重复性所引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(X) = \frac{u(X)}{\bar{X}} = \frac{1}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n(n-1)}} = 0.00299。$$

2.3 相对标准不确定度的合成及扩展

2.3.1 各不确定度分量汇总

各相对标准不确定度分量见表 2。

表 2 相对标准不确定度分量表

Table 2 The relative standard uncertainty components

不确定度来源	类型	相对标准不确定度	相对标准不确定度分量
样品称量过程引入的相对标准不确定度 $U_{rel}(m)$	B	0.000145	0.000145
样品定容过程中引入的相对标准不确定度 $U_{rel}(V)$		0.000783	0.000783
容量瓶校准 $U_{rel}(V_1)$	B	0.000693	
环境温度变化 $U_{rel}(T_1)$	B	0.000364	

续 表

不确定度来源	类型	相对标准 不确定度	相对标准 不确定度分量
标准曲线所得结果引入的相对标准不确定度 $U_{rel}(C)$		0.0131	0.0131
标准物质 $U_{rel}(std)$	B	0.01	
标品称量 $U_{rel}(w)$	B	0.00300	
容量瓶校准 $U_{rel}(V_2)$	B	0.00115	
环境温度变化 $U_{rel}(T_2)$	B	0.000364	
标准曲线拟合 $U_{rel}(q)$	A	0.00788	
各因素造成的重复性引入的相对标准不确定度 $U_{rel}(X)$	A	0.00299	0.00299

2.3.2 合成相对标准不确定度

对上述各不确定度分量进行分析,合成相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(y) = \sqrt{U_{rel}(m)^2 + U_{rel}(V)^2 + U_{rel}(C)^2 + U_{rel}(X)^2} = 0.0135。$$

2.3.3 相对扩展不确定度

取置信概率 95%, $k=2$, 得高效液相色谱法测定酱菜中脱氢乙酸的相对扩展不确定度为:

$$U_{rel} = k \times U_{rel}(y) = 2 \times 0.0135 = 0.0270。$$

2.3.4 扩展不确定度

由实验数据可知样品中脱氢乙酸含量为 0.122 g/kg, 其扩展不确定度为:

$$U = 0.122 \times 0.0270 = 0.003 \text{ g/kg}。$$

2.3.5 结果表示

通过高效液相色谱法测定酱菜中脱氢乙酸含量, 测定结果为:

$$X = (0.122 \pm 0.003) \text{ g/kg}, k=2。$$

3 结论

参照 GB 5009.121-2016 中的方法, 采用高效液相色谱法对酱菜中脱氢乙酸的含量进行了测定, 并根据 JJF 1059.1-2012 和 CNAS-GL006-2019 中规定的方法和程序, 对实验过程中影响脱氢乙酸含量的各不确定度进行分析和评定。通过分析发现, 对测定结果影响最大的是由标准曲线所求得浓度, 其次是测定的重复性。而样品称量和样液定容所引入的不确定

度较小。因此, 在实验过程中我们应选择质量稳定、准确等级较高的标准品, 严格把控标准品的配制过程, 其次可增加标准溶液的浓度点和测定次数, 加强操作人员的培训, 检测仪器的校准等措施减小测定结果的不确定度, 从而提高检测结果的准确性。

参考文献:

[1]高吉祥, 燕平梅. 酱菜发酵中微生物的研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(12): 189-193.

[2]赵凯. 酱菜的营养价值以及包装技术研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(11): 189-191.

[3]田莉, 李静峰, 赵慧玲, 等. HPLC 法测定酱腌菜中脱氢乙酸的含量[J]. 广东化工, 2018, 45(19): 119-120.

[4]胡秀虹, 黄意, 汤承浩, 等. 防腐剂对腌制韭菜根中腐败细菌的抑制效果研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(3): 67-72.

[5]陈晨, 陈妍, 倪炜华, 等. 高效液相色谱法测定食品中脱氢乙酸的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2660-2663.

[6]景赞, 刘超, 黄志勇, 等. 气相色谱法测定甜面酱中脱氢乙酸含量的不确定度评定[J]. 中国调味品, 2019, 44(8): 171-174.

[7]葛静微, 沈莹萍, 马芮萍, 等. HPLC 法测定面包中脱氢乙酸的不确定度评定[J]. 现代食品, 2020(6): 147-153.

[8]ZHANG Y M, DU Y F, YIN J, et al. Determination and depletion of dehydroacetic acid residue in chicken tissues[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2012, 29(6): 918-924.

[9]国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准食品添加剂使用标准: GB 2760-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[10]杨坤, 刘桂琼, 吴凯仪. 超高效液相色谱法同时快速测定陈年菜中安赛蜜、苯甲酸、山梨酸、糖精钠、脱氢乙酸[J]. 中国调味品, 2020, 45(9): 156-159.

[11]张小芳, 付大友. 高效液相色谱法同时测定食醋和酱油中的 6 种防腐剂和甜味剂[J]. 中国调味品, 2018, 43(9): 147-150.

[12]国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品中脱氢乙酸的测定: GB 5009.121-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[13]全国法制计量管理计量技术委员会. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[14]中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL006-2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.

(上接第 151 页)

[3]景赞, 刘超, 黄志勇, 等. 气相色谱法测定甜面酱中脱氢乙酸含量的不确定度评定[J]. 中国调味品, 2019, 44(8): 171-174.

[4]张学英. 盐酸标准滴定液标定的不确定度评定[J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 152-157.

[5]ARROU K J, LIND R C. Uncertainty and the evaluation of public investment decisions[J]. J Nat Resour Policy Res, 2014, 6(1): 29-44.

[6]吴有根, 吴育良. 滴定法测定食醋中总酸含量及其不确定度评定[J]. 中国调味品, 2017, 42(2): 129-133.

[7]中华人民共和国卫生部. 食醋卫生标准的分析方法: GB/T 5009.41-2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[8]国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1-2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2012.

[9]国家质量监督检验检疫总局. 常用玻璃量器: JJG 196-2006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.

[10]国家质量监督检验检疫总局. 在线 pH 计校准规范: JJF 1547-2015[S]. 北京: 中国质检出版社, 2015.