

气相色谱—质谱法测定食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯的测量不确定度评定

Uncertainty evaluation on determination of p-hydroxy benzoic acid ethyl ester in edible betel nut by gas chromatography mass spectrometry

陈幸莺

CHEN Xing-ying

(湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411100)

(Xiangtan Institute for Food and Drug Control, Xiangtan, Hunan 411100, China)

摘要:根据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》的规定,对气相色谱—质谱联用法测定食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯含量的不确定度进行分析,找出影响不确定度的各种因素,计算合成不确定度及扩展不确定度,为其测定方法的探讨和检测报告的评估提供依据。不确定评估结果显示,回收率分量、气相色谱—质谱联用仪分量、测量重复性分量这 3 项引起的不确定度分量对合成不确定度影响较大。

关键词:气相色谱—质谱联用; 槟榔; 对羟基苯甲酸乙酯; 不确定度

Abstract: To analyze the uncertainty evaluation of measurement results for p-hydroxy benzoic acid ethyl ester in edible betel nut by Gas chromatography mass spectrometry, the various factors were found, which affected uncertainty according to JJF 1059.1—2012 *Evaluation and Expression Uncertainty in Measurement*, and evaluated the synthetic uncertainty and expanded it, gave the uncertainty range of the measured value. It was provided support for methods discussing and evaluation on test reports. It is showed that three kind of factor-shave significant contribution to the uncertainty synthesis, such as recovery factor, gas chromatography mass spectrometry and measurement repeatability.

Keywords: GC-MS; edible betel nut; P-hydroxy benzoic acid ethyl ester; uncertainty

测量不确定度是根据所用到的信息,表征赋予被测量值分散性的非负参数^[1]。一个完整的测量结果,除了应给出被测量的最佳估计值外,还应同时给出测定结果的不确定度。食用槟榔作为一种果实加工食品,因原产地和生产加工地域不同、防腐保质要求较高等特点,加工过程中对食品添加剂、防腐剂方面有较高的要求。湖南省地方标准 DB 43/132—

2004《食用槟榔》中规定,防腐剂脱氢乙酸、对羟基苯甲酸酯可用于食用槟榔加工。其中对羟基苯甲酸酯作为毒性较低的一种广谱防腐剂,被包括美国、欧盟、中国在内的许多国家允许应用于食品。DB 43/132—2004 中也规定,槟榔食品中对羟基苯甲酸酯添加量为 0.5 g/kg(以对羟基苯甲酸计)。但近年来有研究^[2]报道对羟基苯甲酸酯类有潜在的雌激素活性,对人体健康安全有一定的影响,专家要求重新评定对羟基苯甲酸酯类物质的每日允许摄入量等安全性评价指标。本研究拟采用气相色谱—质谱联用法测定食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯含量,并依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》的规定找出影响不确定度的各种因素,合成不确定度及扩展不确定度,为其测定方法的探讨和检测结果的评估提供依据。

1 试验部分

1.1 原理

样品酸化后,对羟基苯甲酸酯类用乙酸乙酯提取后,经气相色谱进行分离,以特征离子峰进行定性定量。

1.2 仪器和试剂

气相色谱—质谱联用仪:7890A-5975C 型,美国安捷伦科技有限公司;

电子天平:BS210S 型,德国赛多利斯集团;

乙酸乙酯:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;

对羟基苯甲酸乙酯标准物质:GBW(E)100064,相对扩展不确定度 0.2%, $k=2$,国家标准物质研究中心。

1.3 测量条件

1.3.1 色谱条件 载气:高纯氦气(99.999%);色谱柱:DB-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);柱流速:1.0 mL/min;分流比:10:1;汽化室温度:250℃;柱温程

作者简介:陈幸莺(1978—),女,湘潭市食品药品检验所工程师,硕士。E-mail:66943313@qq.com

收稿日期:2014-09-15

序:初始温度 50 °C,保持 1 min,以 10 °C/min 速率升温至 200 °C,保持 3 min。

1.3.2 质谱条件 传输线温度:220 °C;离子源温度:250 °C;离子化方式:EI;电子能量:70 eV;延迟时间 2.0 min;检测方式:全扫描;质量范围: m/z 25~300。

1.4 测量过程

称取 10 g 试样(精确至 0.000 1 g),加 1 mL 盐酸(1+1)

(V/V)酸化,加 10 mL 饱和氯化钠溶液、准确加入 10.00 mL 乙酸乙酯涡旋 2 min,超声提取 20 min,弃去水层。加入 10 mL 碳酸氢钠溶液(1 g/100 mL),涡旋 2 min,静置 10 min,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液过滤膜供质谱测定。

1.5 质谱图

气相色谱—质谱联用法测得对羟基苯甲酸乙酯的质谱图见图 1。

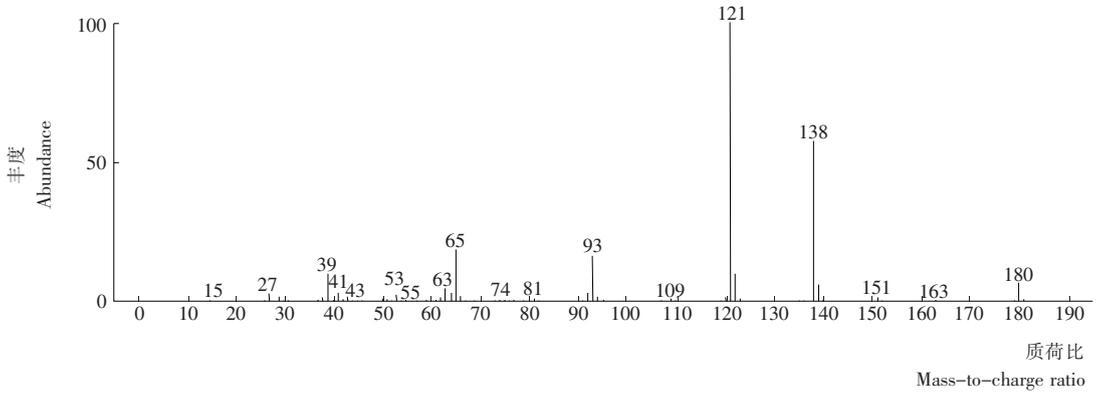


图 1 对羟基苯甲酸乙酯质谱图

Figure 1 P-hydroxy benzoic acid ethyl ester mass spectrogram

2 测量不确定度评定

由测量所得的测得值只是被测量的估计值,测量过程中的系统效应及随机效应均会导致测量不确定度。对于检测结果除了给出最优的估计值外,其相对不确定度评估也相当重要。本研究依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》的方法,建立食用槟榔中对羟基苯甲酸酯类测定结果的数学模型,找寻不确定来源,并对不同类别的不确定分量进行评定,合成不确定度及扩展不确定度。

2.1 测量数学模型

根据本研究的检验原理,评定对羟基苯甲酸乙酯测量结果不确定度的数学模型可以用式(1)表示:

$$X = \frac{c \times v}{m} \tag{1}$$

式中:

X——被测食用槟榔样品中对羟基苯甲酸乙酯含量, g/kg;

c——上机待测液浓度, mg/mL;

v——提取液体积, mL;

m——样品的质量, g。

2.2 不确定度来源分析

气相色谱—质谱联用法测定食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯的不确定度分量主要来自以下几个方面^[3-9](图 2)。

2.3 测量不确定度评定

2.3.1 重复性试验引入的不确定度 在重复性条件下,食用槟榔样品 10 次测定对羟基苯甲酸乙酯含量,测定结果见表 1。重复性引入的不确定度属 A 类评定。

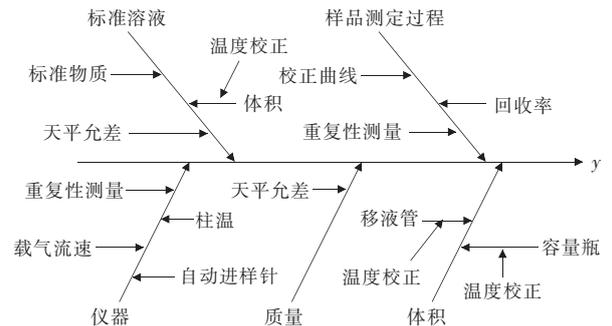


图 2 不确定度来源

Figure 2 The sources of uncertainty

表 1 重复性测定样品的结果

Table 1 Repeated measurements of the sample results

测定次数	含量/(g·kg ⁻¹)	测定次数	含量/(g·kg ⁻¹)
1	0.192	6	0.175
2	0.183	7	0.191
3	0.194	8	0.187
4	0.176	9	0.184
5	0.188	10	0.191

计算测得的样品含量平均值为:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = 0.1861 \text{ (g/kg)}$$

用贝塞尔公式计算试验标准差:

$$s(x) = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0.00627 \text{ (g/kg)}$$

重复性引入的标准不确定度:

$$u_{\Lambda} = \frac{s(x)}{\sqrt{n}} = \frac{0.006\ 27}{\sqrt{10}} = 0.001\ 98\ (\text{g/kg})$$

重复性引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(\Lambda)} = \frac{0.001\ 98}{0.186\ 1} = 0.010\ 6$$

2.3.2 标准溶液引入的不确定度评定

(1) 标准物质的标准值引起的不确定度:本试验方法中拟合校正曲线及分析样品时选用的对羟基苯甲酸乙酯的标准物质[编号 GBW(E)100064],证书提供标准值为 99.7%,相对扩展不确定度为 0.2%, $k=2$,其相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(c)} = \frac{0.2\%}{2} = 0.001\ 00$$

(2) 标准品称量引入的不确定度:天平称量时对示值量化的不确定度服从均匀分布。天平分辨力为 0.1 mg,区间半宽度为 0.05 mg,由此引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(m1)} = \frac{0.05}{1\ 000 \times 0.05 \times 0.997 \times \sqrt{3}} = 0.000\ 579$$

同一样品连续称重 3 次,采用极差法计算标准偏差^[3]: $S_{(m)} = R/C$,其中 R 为极差, $R=0.000\ 2\ \text{g}$; C 为极差系数,经查表 $n=3$ 时极差系数为 1.69,则相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(m2)} = \frac{R}{m \times C \times \sqrt{n}} = 0.000\ 001\ 37$$

合成天平称量不确定度:

$$u_{\text{rel}(m)} = \sqrt{u_{\text{rel}(m1)}^2 + u_{\text{rel}(m2)}^2} = 0.001\ 49$$

(3) 标准溶液配制时引入的不确定度:本试验方法中对羟基苯甲酸乙酯标准储备液,是称取 0.05 g 标准品,用乙酸乙酯溶解,准确定容至 50 mL 容量瓶中。分别移取 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL 标准储备液到 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯定容至刻度,配制成 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL 的标准工作液。在此过程中的不确定度,主要由所用的 1 mL A 级吸量管, 10, 50 mL 容量瓶的不确定度和温度影响的不确定度组成。

① 1 mL A 级吸量管引入的不确定度:根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》,1 mL A 级吸量管的最大允差为 $\pm 0.007\ \text{mL}$ 。按均匀分布,引入的不确定度为:

$$u(v_{1\ \text{mL}}) = \frac{0.007}{\sqrt{3}} = 0.004\ 04\ (\text{mL})$$

1 mL 吸量管校正温度为 20 °C,试验温度 15 °C,温度波动 5 °C,乙酸乙酯膨胀系数是 $1.38 \times 10^{-3}\ \text{°C}^{-1}$,按均匀分布考虑,温度引入的不确定度为:

$$u(v_{1\ \text{mL,温}}) = \frac{1 \times 1.38 \times 10^{-3} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.003\ 98\ (\text{mL})$$

其相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(v_{1\ \text{mL}})} = \sqrt{\left[\frac{u(v_{1\ \text{mL}})}{1}\right]^2 + \left[\frac{u(v_{1\ \text{mL,温}})}{1}\right]^2} =$$

0.005 67

② 同理,10 mL 容量瓶引入的不确定度为:

$$u(v_{10\ \text{mL}}) = \frac{0.020}{\sqrt{3}} = 0.011\ 5\ (\text{mL})$$

温度引入的不确定度为:

$$u(v_{10\ \text{mL,温}}) = \frac{10 \times 1.38 \times 10^{-3} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.039\ 8\ (\text{mL})$$

其相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(v_{10\ \text{mL}})} = \sqrt{\left[\frac{u(v_{10\ \text{mL}})}{10}\right]^2 + \left[\frac{u(v_{10\ \text{mL,温}})}{10}\right]^2} =$$

0.004 14

③ 同理,50 mL 容量瓶引入的不确定度为:

$$u(v_{50\ \text{mL}}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.028\ 9\ (\text{mL})$$

温度引入的不确定度为:

$$u(v_{50\ \text{mL,温}}) = \frac{50 \times 1.38 \times 10^{-3} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.199\ (\text{mL})$$

其相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(v_{50\ \text{mL}})} = \sqrt{\left[\frac{u(v_{50\ \text{mL}})}{50}\right]^2 + \left[\frac{u(v_{50\ \text{mL,温}})}{50}\right]^2} =$$

0.004 02

则配制标准溶液过程中引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(v)} =$$

$$\sqrt{[u_{\text{rel}(v_{1\ \text{mL}})}]^2 + [u_{\text{rel}(v_{10\ \text{mL}})}]^2 + [u_{\text{rel}(v_{50\ \text{mL}})}]^2} =$$

0.008 09

(4) 标准工作溶液的相对不确定度:

$$u_{\text{rel}(Cs)} = \sqrt{[u_{\text{rel}(c)}]^2 + [u_{\text{rel}(m)}]^2 + [u_{\text{rel}(v)}]^2} =$$

0.008 29

2.3.3 称量引入的不确定度评定 样品称量与标准物质称量为同一天平,同 2.3.2,天平引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(m1)} = \frac{0.05}{1\ 000 \times 10 \times \sqrt{3}} = 0.000\ 002\ 89$$

同一样品连续称重 3 次,相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(m2)} = \frac{R}{m \times C \times \sqrt{n}} = 0.000\ 006\ 83$$

合成天平称量不确定度:

$$u_{\text{rel}(m)} = \sqrt{u_{\text{rel}(m1)}^2 + u_{\text{rel}(m2)}^2} = 0.000\ 007\ 42$$

2.3.4 提取液体积引入的不确定度评定 本试验方法提取溶液体积为 10.00 mL,同 2.3.2,10.00 mL 吸量管引入的标准不确定度为:

$$u(v_{10}) = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 0.011\ 5\ (\text{mL})$$

温度引入的不确定度为:

$$u(v_{10,温}) = \frac{10 \times 1.38 \times 10^{-3} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.039\ 8\ (\text{mL})$$

其相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}(v)} = \sqrt{\left[\frac{u(v_{10})}{10}\right]^2 + \left[\frac{u(v_{10,温})}{10}\right]^2} = 0.004\ 14$$

2.3.5 仪器引入的不确定度

(1) 自动进样针进样体积引入的不确定度:10 μL 气相

色谱自动进样针示值最小刻度为 0.2 μL,实际最大误差以 0.02 μL 计^[4],进样体积 1 μL,进样体积服从均匀分布,其相对标准不确定度为:

$$u_{rel(inj)} = \frac{2 \times 10^{-5}}{\sqrt{3} \times 1} = 0.000\ 011\ 5$$

(2) 载气流速引入的不确定度:JJG 700—1999 中对于载气流速稳定性的要求是:10 min 之内,波动范围不超过 ±1%。本试验以此上限和下限来考核评定载气流速引入的不确定度。

(3) 气相色谱柱箱温度控制引入的不确定度:JJF 1164—2006 中对于气相色谱柱箱温度稳定性的要求是:10 min 之内,程序升温重复性优于 ±2%。本试验以此上限和下限来考核评定载气流速引入的不确定度。

(4) GC—MS 重复性引入的不确定度:在重复性条件下,对同一对羟基苯甲酸乙酯标准溶液连续进行 10 次测定,所得峰面积见表 2。重复性引入的不确定度属 A 类评定。

表 2 对羟基苯甲酸标准溶液的峰面积

Table 2 Peak area of p-hydroxy benzoic acid ethyl ester standard solution

测定次数	峰面积	测定次数	峰面积
1	2 163 056 951	6	2 163 056 312
2	2 162 162 543	7	2 163 958 192
3	2 164 257 480	8	2 163 057 733
4	2 162 961 365	9	2 162 155 698
5	2 164 158 416	10	2 163 063 146

表 3 对羟基苯甲酸标准溶液的峰面积峰面积 A_i

Table 3 Peak area of p-hydroxy benzoic acid ethyl ester standard solution

浓度/(mg·mL ⁻¹)	A_1	A_2	A_3	\bar{A}_i
0.05	376 458 219	374 784 074	373 659 172	374 967 155
0.1	737 569 147	739 929 782	741 687 934	739 728 954
0.2	1 484 120 720	1 476 912 483	1 468 159 732	1 476 397 645
0.3	2 128 059 464	2 120 649 713	2 117 864 513	2 122 191 230
0.4	2 940 294 402	2 923 916 457	2 935 178 936	2 933 129 931
0.5	3 621 358 974	3 613 358 974	3 602 358 974	3 612 358 974

其中:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n [A_i - (b + aC_i)]^2} \quad (3)$$

式中:

S——拟合标准曲线的标准偏差;

a——标准曲线斜率,7 247 721 014.57;

b——标准曲线截距,0;

n——标准曲线浓度点数,18;

p——样品重复测定次数,10;

C_i ——标准点浓度值,mg/mL;

计算测得的对羟基苯甲酸乙酯标准溶液峰面积平均值为:

$$\bar{x}_{inA} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = 2\ 163\ 188\ 783$$

用贝塞尔公式计算试验标准差:

$$s(x_{inA}) = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 7\ 389\ 423$$

重复性引入的标准不确定度:

$$u_{inA} = \frac{s(x)}{\sqrt{n}} = \frac{0.006\ 5}{\sqrt{10}} = 233\ 674$$

重复性引入的相对不确定度为:

$$u_{rel(inA)} = \frac{233\ 674}{2\ 163\ 188\ 783} = 0.000\ 108$$

(5) 合成仪器的相对标准不确定度为:

$$u_{rel(in)} = \sqrt{u_{rel(inj)}^2 + u_{rel(in气)}^2 + u_{rel(in温)}^2 + u_{rel(inA)}^2} = \sqrt{0.000\ 011\ 5^2 + 0.01^2 + 0.02^2 + 0.000\ 108^2} = 0.022\ 4$$

2.3.6 样品测定过程产生的不确定度

(1) 校正曲线拟合引入的不确定度:对各对羟基苯甲酸标准工作溶液测定 3 次(表 3),以浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

得拟合标准曲线方程: $y=ax+b$, $a=7\ 247\ 721\ 014.57$, $b=0$, $R^2=0.999\ 4$ 。标准工作曲线拟合引入的不确定度 u_{cu} 由式(2)计算^[3]:

$$u_{(cu)} = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(\bar{x} - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{c})^2}} \quad (2)$$

\bar{c} ——标准溶液平均浓度,mg/mL;

\bar{A}_i ——标准浓度 C_i 对应的平均峰面积。

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n [\bar{A}_i - (b + aC_i)]^2} = 1.787 \times 10^7$$

$$u_{(cu)} = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(\bar{x} - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{c})^2}} = 0.001\ 04\ (g/kg)$$

标准曲线拟合引入的相对不确定度:

$$u_{rel(cu)} = \frac{u_{(cu)}}{0.186\ 1} = 0.005\ 59$$

(2) 回收率引入的不确定度:气相色谱—质谱联用法测定食品中对羟基苯甲酸乙酯含量,要经过涡旋提取、超声提取、离心沉淀、过滤膜等步骤。如果对每一步骤进行不确定度评定,部分难以确定的因素评定起来会有一定的难度,本试验方法以回收率来进行综合评定。待测样在回收率的试验中,是被设定为与实际检测进程相同的载体条件。

对食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯进行回收率试验,6 次试验结果回收率在 91.4%~112.1%,回收率的可能值的上界、下界与最佳估计值 100%不对称。在有效信息短缺的情况下,按均匀分布来处理不确定度评定,由此产生的标准不确定度采用式(4)计算^[5]:

$$u_{(rec)} = \sqrt{\frac{(b_+ + b_-)^2}{k}} \quad (4)$$

式中:

$U_{(rec)}$ ——样品测定过程中回收率的标准不确定度;

b_+ ——回收率按其估计值的偏差上限;

b_- ——回收率按其估计值的偏差下限;

k ——回收率界限不对称时, $k=12$ 。

$$u_{(rec)} = \sqrt{\frac{[(112.1\% - 100\%) + (100\% - 91.4\%)]^2}{12}} = 0.0572$$

相对不确定度为:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{(u_{rel}A)^2 + (u_{rel}Cs)^2 + (u_{rel}m)^2 + (u_{rel}v)^2 + (u_{rel}in)^2 + (u_{rel}T)^2} = \sqrt{0.0106^2 + 0.00829^2 + 0.00000742^2 + 0.00414^2 + 0.0224^2 + 0.0575^2} = 0.0633$$

2.5 扩展不确定度

在置信概率取 95%的情况下,包含因子 $k=2$ 。相对扩展不确定度为:

$$U_{95rel} = k \times u_{rel}x = 2 \times 0.0633 = 0.127$$

由试验数据的平均值计算得该食用槟榔样品中对羟基苯甲酸乙酯含量的最佳估计值:

$$X = 0.186 \text{ (g/kg)}$$

故其扩展不确定度为:

$$U_{95} = 0.186 \times 0.127 \approx 0.024 \text{ (g/kg)}$$

该食用槟榔样品中对羟基苯甲酸乙酯含量的测量不确定度报告:

$X = (0.186 \pm 0.024) \text{ g/kg}$ (包含因子 $k=2$, 置信概率 95%)。

3 结论

以气相色谱—质谱联用法测定食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯为例,对测定食用槟榔中对羟基苯甲酸乙酯的测量不确定度来源进行了分析和量化评定,结果表明测定过程中的回收率、气相色谱—质谱联用仪、测量重复性分量对不确定度的影响较大,而质量、提取液体积等对测量不确定度影响较小。因此要减小不确定度,得到准确性高的测量结果,应选用稳定性好的仪器、选择合理的测定方法,并规范检验

$$u_{rel(rec)} = \frac{u_{(rec)}}{100\%} = 0.0572$$

样品测定过程产生的不确定度:

$$u_{rel(T)} = \sqrt{[u_{rel(Cu)}]^2 + [u_{rel(rec)}]^2} = 0.0575$$

2.4 合成标准不确定度

综上所述,各不确定度分量对合成不确定度的影响分布见图 3。

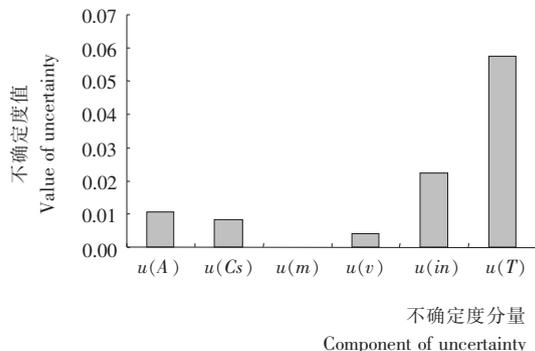


图 3 测量不确定度分量分布示意图

Figure 3 Distribution diagram of each component of uncertainty

在不考虑各输入量之间的相关性的情况下,以方和根合成相对标准不确定度:

操作。

参考文献

- 1 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社,2012.
- 2 葛均辉,常兵. 对羟基苯甲酸酯类物质的雌激素活性[J]. 卫生研究,2006,35(5):650~652.
- 3 丁进锋,赵凤敏. 气相色谱测定大米粉中 O,P'-DDT 不确定度分析[J]. 食品与机械,2013,29(5):80~83.
- 4 邵华,刘肃,钱永忠,等. 气相色谱—质谱联用法测定乐果的不确定度评定[J]. 分析试验室,2006,25(6):84~87.
- 5 常晓途,陈新焕,杨代明,等. 直接测汞仪测定大米中汞的不确定度评定[J]. 食品与机械,2010,26(3):85~87.
- 6 曹小彦,张燕,黄雄伟,等. 气相色谱法测定葡萄酒中甲醇含量不确定度评定[J]. 食品与机械,2013,29(6):76~78.
- 7 殷俊,黎瑛,周金沙,等. 原子荧光法测定罐头食品中锡含量的不确定度评定[J]. 食品与机械,2012,28(3):68~70.
- 8 李淑静,陈其勇,宓捷波,等. 气相色谱—质谱法测定葡萄酒中邻苯二甲酸二丁酯含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(9):2899~2902.
- 9 国家质量监督检验检疫总局. JJG 196—2006 常用玻璃量器检定规程[S]. 北京:中国计量出版社,2007.