

LC-MS/MS 法测定骨汤宝中 3 种生物碱残留量的不确定度评估

Measurement uncertainty of 3 alkaloids in soup flavor seasoning by LC-MS/MS

马丽幸¹ 卢旭² 陈日春¹

MA Li-xing¹ LU Xu² CHEN Ri-chun¹

(1. 福建赛福食品检测研究所有限公司, 福建 福州 350011; 2. 福建农林大学, 福建 福州 350002)

(1. Fujian Saifu Food Inspection Research Institute Co., Ltd., Fuzhou, Fujian 350011, China;

2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

摘要:为合理表征 LC-MS/MS 法检测骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因残留量检测结果的离散性,提升检测结果的完整性和可靠性。依据 DB 31/2010—2012《食品安全地方标准 火锅食品中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因的测定 液相色谱—串联质谱法》对骨汤宝中的罂粟碱、那可丁和蒂巴因残留量进行测定,分析检测过程中测量不确定度的来源,进行不确定度评定,并合成总不确定度。结果表明,罂粟碱、那可丁、蒂巴因的合成相对标准不确定度分别为 0.475, 0.575, 1.897; 不确定度主要来源于标准液的配制、标准曲线的制作和试验重复性。

关键词:LC-MS/MS; 骨汤宝; 罂粟碱; 那可丁; 蒂巴因; 不确定度

Abstract: In order to properly improve the integrity and reliability of the results, the LC-MS/MS method was used to determine the discrepancy of the detection results of papaverine, narcotine, thebaine in soup flavor seasoning powder. This paper based on “DB 31/2010—2012 of local standards for food safety, the Determination of Papaverine, Morphine, Narcotine, Codeine and Thebaine in Hot Pot Food by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, analyzed the residue results of papaverine, narcotine, thebaine in soup flavor seasoning powder and the sources of the uncertainty of measurement. It also synthesized the total uncertainty. The results showed that the synthesis of relative standard uncertainty for papaverine, narcotine, thebaine were 0.475, 0.575, 1.897, respectively. The source was mainly comes from configuration of the standard solution, standard curve and experimental repeatability.

Keywords: LC-MS/MS; soup flavor seasoning powder; papaverine; narcotine; thebaine; the uncertainty of measurement

GB/T 27025—2008《检测和校准实验室能力的通用要求》规定,检测和校准实验室都必须建立对测量结果进行不确定度评定的程序,并有能力应用这些程序对试验过程中得出的每一项数值进行测量不确定度的评定。

罂粟壳中以吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因 5 种生物碱为其主要成分,这些生物碱有麻痹神经的作用,长期食用会引起精神失常,心脏血液阻滞、不正常颤动,甚至死亡^[1]。国际条约关于麻醉品和精神药物管理指导原则中规定罂粟壳为禁止添加的非食用物质^[2],然而一些不法经营者在餐饮食品中添加罂粟壳等违禁原料,使食物更加鲜美,吸引更多食客,牟取暴利^[3]。2016 年初,中国有 35 家餐企因在食品中添加罂粟壳被曝光,5 家被移送公安机关并已提起公诉,20 家被移送公安机关立案侦查,10 家被食品药品监管部门立案调查^[4]。骨汤宝作为一种鲜味粉复合调味料,常用于调制骨汤底、面汤底的火锅,在餐厅或家庭火锅聚会中大量使用。因此评定在骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因残留量的不确定度也非常有必要。目前罂粟壳生物碱的检测方法主要有:化学分析法、色谱法、免疫分析法、示波极谱法、层析法等^[5-6]。

本试验依据 DB 31/2010—2012《食品安全地方标准 火锅食品中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因的测定 液相色谱—串联质谱法》,采用 LC-MS/MS 联用技术测定骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因的含量,分析了样品称量过程、标准品溶液的配制、标准曲线的拟合、进样体积、试验重复性、实验室温度等影响样品测定结果不确定度的主要来源^[7-8],并对不确定度进行评估,为 LC-MS/MS 法对骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因含量的准确测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

罂粟碱标准物质:99.9%±0.5%,PVR-494032,Stanford

作者简介:马丽幸(1989—),女,福建赛福食品检测研究所有限公司工程师,本科。E-mail: 181390047@qq.com

收稿日期:2017—09—11

Chemicals Company;

那可丁标准物质:99.9%±0.5%,NCP-510809,Stanford Chemicals Company;

蒂巴因标准物质:99.9%±0.5%,TB-201988,Stanford Chemicals Company;

乙腈:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;

无水硫酸镁、无水醋酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

分散型固相萃取小柱:填料为50 mg PSA(Primary Secondary Amine sorbent, *N*-丙基乙二胺固相吸附剂),100 mg 无水硫酸镁,100 mg C₁₈,天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高效液相色谱—串联四极杆质谱联用仪:LCMS8030型,日本岛津公司;

氮气发生器:LC-MS30-1-E型,英国 Domnick hunter 公司;

高速冷冻离心机:GL-20G-H型,上海安亭科学仪器厂;

调速多用振荡器:HY-4型,金坛市江南仪器厂;

快速混匀器:XK80-A型,江苏新康医疗器械有限公司;

可调微量移液器:100~1 000 μL,北京 Dragon Lab 公司;

电子天平:JJ300型,常熟市双杰测试仪器厂;

分析天平:AR2140型,美国奥豪斯公司;

所用玻璃器皿均为A级。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制 精确称取盐酸罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准品各10 mg,分别用0.5%甲酸—甲醇溶液配制浓度为1.0 mg/mL的溶液,作为标准储备液。用移液器移取100 μL标准储备溶液,用乙腈定容至10 mL,配成10 μg/mL的标准中间液;再分别用移液器取10 μg/mL标准中间液100 μL,用乙腈定容至10 mL,配成100 ng/mL的罂粟碱、那可丁、蒂巴因混合标准使用液;分别用移液管准确吸取0.10, 0.20,0.50,1.00,2.00,5.00 mL的罂粟碱、那可丁、蒂巴因混合标准使用液,用乙腈稀释至10.0 mL,得罂粟碱、那可丁、蒂巴因为1.00,2.00,5.00,10.00,20.00,50.00 ng/mL的混合标准工作液。

1.2.2 样品前处理 准确称取2.00 g骨汤宝于50 mL聚四氟乙烯具塞离心管中,加入5 mL二次水,振摇,加15 mL乙腈,旋涡振荡1 min,加入6 g无水硫酸镁和1.5 g无水醋酸钠的混合粉末,迅速振摇,涡旋振荡1 min,于4 000 r/min离心5 min^[9],取上清液待净化。

移取1.5 mL上清液于分散型固相萃取小柱中,旋涡振荡1 min,于10 000 r/min离心2 min,取上清液,0.22 μm滤膜过滤,取滤液待测。

1.2.3 加标试样制备 平行称取6份试样,每份2.00 g于50 mL聚四氟乙烯具塞离心管中,分别加入浓度为20 ng/mL的罂粟碱、那可丁、蒂巴因混合标准溶液1.0 mL、其余步骤同1.2.2样品前处理。

1.2.4 色谱质谱条件

(1) 色谱条件:室温(25±2)℃,湿度<60%,220 V稳压电源;色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,C₁₈柱75 mm×2.0 mm,粒度2.2 μm;流动相:0.1%甲酸乙腈与0.1%甲酸的10 mmol/L甲酸铵溶液体积比为80:20;流速0.3 mL/min;柱温40℃;进样量10 μL。

(2) 质谱条件:质谱采用电喷雾(ESI)离子源,在正离子模式下扫描,多反应监测(MRM);离子源电压—3.5 kV,离子源温度350℃,脱溶剂管温度250℃,加热模块温度400℃;雾化气流速3.00 L/min,干燥气流速15.0 L/min;驻留时间30 ms;罂粟碱、那可丁、蒂巴因定性、定量离子对及碰撞电压等质谱参数见表1。

表1 质谱条件参数 [†]					
Table 1 Quality parameters for LC-MS/MS					
组分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碰撞室入口 电压/V	碰撞电压/ V	碰撞室出口 电压/V
罂粟碱	340.00	* 202.10	—12.0	—30.0	—13.0
		324.15	—12.0	—30.0	—22.0
那可丁	414.20	* 220.10	—25.0	—25.0	—15.0
		353.10	—25.0	—25.0	—25.0
蒂巴因	312.00	* 58.10	—11.0	—25.0	—22.0
		30.10	—11.0	—50.0	—29.0

† *表示定量离子。

2 测量数学模型

2.1 建立数学模型

根据1.2.2所述的试验方法,骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因含量按式(1)计算。

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000},$$

(1)

式中:

X——样品中待分析物的残留量,μg/kg;

c——从标准曲线中读出的供试品溶液中各待测物的浓度,ng/mL;

V——样液的提取体积,mL;

m——样品称样量,g。

2.2 不确定度来源分析

影响骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因检测结果的不确定度引入因素有:称取质量、标准液的配制、进样体积、标准曲线、试验重复性、加标回收率^[10-11]。

3 不确定度评定

不确定度评定方法依据JJF 1059—1999《测量不确定度评定与表示》与GB/T 27411—2012《检测实验室中常用不确定度评定方法与表示》。不确定度测定与计算过程中涉及的计量术语及定义参照JJF 1001—2011《通用计量术语及定义》^[12]。

3.1 分量标准不确定度分析

3.1.1 称取质量引入的不确定度 使用万分之一天平分别称量10.0 mg(*M_b*)罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准物质,精确至

0.1 mg。检定证书给出的最小分度值为 $d=0.1\text{ mg}$, 区间半宽度 $a=0.5d=0.05\text{ mg}$, 服从均匀分布, $k=3^{[13]}$, 由于称取质量一致, 故罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准物质称量引入的相对标准不确定度均为:

$$u_1(M)=\frac{a}{k\times W_b}=\frac{0.05}{\sqrt{3}\times 10.0}=0.002\ 89。$$

使用百分之一天平称量 2.00 g(M_y) 样品, 精确至 0.01 g。检定证书给出的最小分度值为 $d=0.01\text{ g}$, 区间半宽度 $a=0.5d=0.005\text{ g}$, 服从均匀分布, $k=3$, 因此样品称量引入的相对标准不确定度为:

$$u_2(M)=\frac{a}{k\times W_y}=\frac{0.005}{\sqrt{3}\times 2.00}=0.001\ 44。$$

由于 $u_1(M)$ 与 $u_2(M)$ 互不相关, 因此称取质量引入的相对标准不确定度:

$$u_{rel}(1)=\sqrt{u_1^2(M)+u_2^2(M)}=\sqrt{0.002\ 89^2+0.001\ 44^2}=0.003\ 23。$$

3.1.2 标准液的配制引入的不确定度 以 10.0 ng/mL 标准工作溶液为例阐述不确定度的大小, 按 1.2.1 配制, 稀释因子为 $f_1=\frac{V_{10}}{V_{0.1}}=100$ 、 $f_2=f_1=\frac{V_{10}}{V_{0.1}}=100$ 、 $f_3=\frac{V_{10}}{V_1}=10$, 则将 1.00 mg/mL 标准储备液稀释至 10 ng/mL, 总的稀释因子为: $c_{0.1}=\frac{C_{stock}}{f_1\times f_2\times f_3}=\frac{C_{stock}}{f_1^2\times f_3}。$

因此, 配制 10.0 ng/mL 标准工作溶液所引入的不确定度为:

$$\frac{u_c(10)}{10}=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left[\frac{u_c(f_1)}{f_1}\right]^2+\left[\frac{u_c(f_3)}{f_3}\right]^2}。(2)$$

罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准品纯度为 (C_{stock} 分别为 99.9%±0.5%, 99.9%±2.0%, 98.2%±2.0%), 按照均分布转化, 由标准品的纯度引起的不确定度为:

罂粟碱: $\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}=\frac{0.005}{99.9}=0.000\ 050\ 1;$

罂粟碱: $u_{rel}(2)=\frac{u_c(10)}{10}=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left[\frac{u_c(f_1)}{f_1}\right]^2+\left[\frac{u_c(f_3)}{f_3}\right]^2}$
 $=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left\{\left[\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}\right]^2+\left[\frac{u_c(V_{0.1})}{V_{0.1}}\right]^2\right\}+\left\{\left[\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}\right]^2+\left[\frac{u_c(V_1)}{V_1}\right]^2\right\}}$
 $=\sqrt{0.000\ 050\ 1^2+2(0.001\ 08^2+0.004\ 56^2)+(0.001\ 08^2+0.004\ 04^2)}=0.007\ 836;$

那可丁: $u_{rel}(2)=\frac{u_c(10)}{10}=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left[\frac{u_c(f_1)}{f_1}\right]^2+\left[\frac{u_c(f_3)}{f_3}\right]^2}$
 $=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left\{\left[\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}\right]^2+\left[\frac{u_c(V_{0.1})}{V_{0.1}}\right]^2\right\}+\left\{\left[\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}\right]^2+\left[\frac{u_c(V_1)}{V_1}\right]^2\right\}}$
 $=\sqrt{0.000\ 200^2+2(0.001\ 08^2+0.004\ 56^2)+(0.001\ 08^2+0.004\ 04^2)}=0.007\ 839;$

蒂巴因: $u_{rel}(2)=\frac{u_c(10)}{10}=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left[\frac{u_c(f_1)}{f_1}\right]^2+\left[\frac{u_c(f_3)}{f_3}\right]^2}$
 $=\sqrt{\left[\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}\right]^2+2\left\{\left[\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}\right]^2+\left[\frac{u_c(V_{0.1})}{V_{0.1}}\right]^2\right\}+\left\{\left[\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}\right]^2+\left[\frac{u_c(V_1)}{V_1}\right]^2\right\}}$
 $=\sqrt{0.000\ 204^2+2(0.001\ 08^2+0.004\ 56^2)+(0.001\ 08^2+0.004\ 04^2)}=0.007\ 839。$

那可丁: $\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}=\frac{0.02}{99.9}=0.000\ 200;$

蒂巴因: $\frac{u_c(C_{stock})}{C_{stock}}=\frac{0.02}{98.2}=0.000\ 204。$

100 μL 移液器检定证书给定的允许误差为 0.7 μL, 按照均匀分布换算成标准偏差为: $u_{c1}(V_{0.1})=\frac{0.7}{\sqrt{3}}=0.41\ \mu\text{L}$; 实

验室温度一般在 (25±3) °C, 置信水平为 95%, 乙腈的体积膨胀系数 $1.1\times 10^{-3}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$, 玻璃的膨胀系数 $2.5\times 10^{-5}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ [14], 因此产生的体积变化为 $\pm 3\times 100\times (1.1\times 10^{-3}-2.5\times 10^{-5})=\pm 0.33\ \mu\text{L}$, 按照均匀分布换算成

标准偏差为: $u_{c2}(V_{0.1})=\frac{0.33}{\sqrt{3}}=0.20\ \mu\text{L}$; 则由 100 μL 移液

器移取 100 μL 标准液时引入的相对不确定度:

$$\frac{u_c(V_{0.1})}{V_{0.1}}=\sqrt{u_{c1}^2(V_{0.1})+u_{c2}^2(V_{0.1})}=\frac{\sqrt{0.41^2+0.20^2}}{100}=0.004\ 56。$$

依据 JJG 196—2006《常用玻璃量器计量检定规程》, A 级单标线玻璃量器移液管、容量瓶的最大允差与相对标准不确定度见表 2。

表 2 实验室 A 级单标线玻璃量器的分度值与容量允差
Table 2 The index of tolerance value and capacity of Lab level A single line volumetric pipette

量器	容量允差/mL	不确定度/mL	相对不确定度/%
1 mL 移液管	±0.070	0.004 04	0.404 0
2 mL 移液管	±0.010	0.005 77	0.288 0
10 mL 容量瓶	±0.025	0.008 20	0.108 0
25 mL 容量瓶	±0.030	0.017 30	0.086 5

按均匀分布评定, 由 1 mL 移液管移液所引入的相对不确定度 $\frac{u_c(V_1)}{V_1}=0.004\ 04$; 由 10 mL 容量瓶定容所引入的

相对不确定度 $\frac{u_c(V_{10})}{V_{10}}=0.001\ 08$ 。因此, 由配制罂粟碱、那

可丁、蒂巴因标准液所引入的相对不确定度:

3.1.3 进样体积引入的不确定度 将 1.3.1 配制的混标液上机,由进样体积引起的不确定度 $u_{rel}(V_i)$ 及试样进样体积引起的不确定度 $u_{rel}(V_x)$ (B 类不确定度)均由定量环引起,可视 为同一值。定量环体积误差为:±0.1 μL,按均匀分布,其标准 不确定度为: $u(V) = 0.1/\sqrt{3} = 0.057\ 7\ \mu\text{L}$,试验中所进标液与 样品溶液的体积均为 10 μL,由于 3 种物质配制成混合标液, 则 3 种物质由进样体积引起的相对标准不确定度均为:

$$u_{rel}(3) = \frac{u_{rel}(V)}{V} = \frac{0.057\ 7}{10} = 0.005\ 77。$$

3.1.4 标准曲线引入的不确定度 用 HPLC-MS/MS 法测 定罂粟碱、那可丁、蒂巴因的质量浓度,为了校准液相色谱一 串联四级杆质谱仪,采用罂粟碱、那可丁、蒂巴因混合标准使 用液 100 ng/mL 分别配制了 6 种浓度的混合标准溶液,罂粟 碱、那可丁、蒂巴因质量浓度依次为 1.0,2.0,5.0,10.0,20.0, 50.0 ng/mL;用 HPLC-MS/MS 测定罂粟碱、那可丁、蒂巴因 标准物质峰面积 ($A_{i\ n}$),每个浓度重复进样 6 次,结果见 表 3。

用最小线性二乘法拟合回归方程得,罂粟碱: $y = 90\ 363.7x + 9\ 286.09$,线性拟合度 $r = 0.999\ 9$;那可丁: $y = 71\ 819.3x + 23\ 157.0$,线性拟合度 $r = 0.999\ 1$;蒂巴因: $y = 161\ 082.x - 16\ 180.4$,线性拟合度 $r = 0.999\ 8$ 。从拟合曲线 上得到结果的不确定度为:

$$u_{rel}(4) = \frac{S}{b} \times \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\rho_0 - \overline{\rho_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\rho_i - \overline{\rho_i})^2}}, \quad (3)$$

式中:
 S ——拟合曲线的标准偏差;
 P ——样品溶液测定的总次数, $P = 6$;
 n ——标准溶液测定的总次数, $n = 36$;
 N ——标准溶液浓度的个数, $N = 6$;
 ρ_0 ——样品溶液中罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度的平均 值,分别为 18.528,19.482,20.415 ng/mL;
 ρ_i ——各标准溶液中罂粟碱、那可丁、蒂巴因的浓度, ng/mL;
 $\overline{\rho_i}$ ——标准溶液中罂粟碱、那可丁、蒂巴因的浓度平均 值,17.667 ng/mL。

拟合曲线试验的标准偏差为:

$$\begin{aligned} \text{罂粟碱: } S &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b\rho_i + a)]^2}{n - 2}} = 97\ 435.76; \\ \text{那可丁: } S &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b\rho_i + a)]^2}{n - 2}} = 93\ 207.79; \\ \text{蒂巴因: } S &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b\rho_i + a)]^2}{n - 2}} = 68\ 894.56; \\ \sum_{i=1}^N (\rho_i - \overline{\rho_i})^2 &= (1.0 - 17.667)^2 + (2.0 - 17.667)^2 + \\ &(5.0 - 17.667)^2 + (10.0 - 17.667)^2 + (20.0 - 17.667)^2 + \\ &(50.0 - 17.667)^2 = 1\ 793.094。 \end{aligned}$$

表 3 标准溶液检测结果
Table 3 The test results of standard

名称	浓度 $c /$ (ng · mL ⁻¹)	A_{i1}	A_{i2}	A_{i3}	A_{i4}	A_{i5}	A_{i6}	均值
罂粟碱	1.00	83 680	89 052	84 126	83 788	84 684	79 033	84 061
	2.00	173 946	193 771	189 359	194 544	191 789	192 550	189 327
	5.00	434 550	474 902	456 782	472 081	458 267	461 213	459 633
	10.00	964 841	947 785	918 144	910 382	930 524	902 112	928 965
	20.00	1 657 623	1 934 250	1 695 343	1 987 522	1 679 858	1 779 522	1 789 020
	50.00	4 939 036	4 423 083	4 402 433	4 463 223	4 473 175	4 430 130	4 521 847
那可丁	1.00	70 348	74 020	72 760	71 262	72 782	73 551	72 454
	2.00	162 369	153 235	157 626	162 519	166 332	163 600	160 947
	5.00	419 249	402 327	395 087	415 425	383 293	368 787	397 361
	10.00	619 628	797 545	785 224	811 019	738 830	793 149	757 566
	20.00	1 567 845	1 465 323	1 398 656	1 676 521	1 523 145	1 419 566	1 508 509
	50.00	3 889 297	3 746 685	3 801 730	3 867 789	3 605 500	3 598 453	3 751 576
蒂巴因	1.00	149 429	144 314	144 009	146 753	143 039	142 515	145 010
	2.00	327 932	322 494	316 171	313 504	303 515	312 531	316 025
	5.00	733 178	796 880	801 255	805 224	807 727	794 952	789 869
	10.00	1 465 912	1 590 465	1 606 441	1 622 125	1 587 989	1 580 941	1 575 646
	20.00	3 370 913	3 106 015	3 056 787	3 332 121	3 272 589	3 175 848	3 219 046
	50.00	8 189 305	7 993 224	8 099 452	7 982 631	7 943 057	7 906 999	8 019 111

因此,由标准曲线拟合引起的相对不确定度为:

罂粟碱: $u_{rel}(4) = \frac{S}{b} \times \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\rho_0 - \overline{\rho_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\rho_i - \overline{\rho_i})^2}} =$
 $\frac{97\,435.76}{90\,363.7} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(18.528 - 17.667)^2}{1\,793.094}} = 0.475;$

那可丁: $u_{rel}(4) = \frac{S}{b} \times \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\rho_0 - \overline{\rho_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\rho_i - \overline{\rho_i})^2}} =$
 $\frac{93\,207.79}{71\,819.3} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(19.482 - 17.667)^2}{1\,793.094}} = 0.575;$

蒂巴因: $u_{rel}(4) = \frac{S}{b} \times \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\rho_0 - \overline{\rho_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\rho_i - \overline{\rho_i})^2}} =$
 $\frac{68\,894.56}{16\,180.4} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(20.415 - 17.667)^2}{1\,793.094}} = 1.897。$

3.1.5 试验重复性引入的不确定度 重复性引入的不确定度为 A 类不确定度^[15],试验中,在一定时间内对 6 份加标供试品中罂粟碱、那可丁、蒂巴因残留量测定结果见表 4。

重复性测量的 A 类标准不确定度根据贝塞尔公式计算:

罂粟碱:

$$u(A) = S(A)/\sqrt{n} = [\sum_{i=1}^n (A_i - A)^2 / n - 1] \frac{1}{2} / \sqrt{6} =$$

$$\{[(18.801 - 18.528)^2 + (18.535 - 18.528)^2 + (18.321 - 18.528)^2 + (18.732 - 18.528)^2 + (18.345 - 18.528)^2 + (18.433 - 18.528)^2] / (6 - 1)\}^{\frac{1}{2}} / \sqrt{6} = 0.081\,9;$$

那可丁:

$$u(A) = S(A)/\sqrt{n} = [\sum_{i=1}^n (A_i - A)^2 / n - 1] \frac{1}{2} / \sqrt{6} =$$
$$\{[(19.187 - 19.428)^2 + (19.994 - 19.428)^2 + (19.322 - 19.428)^2 + (19.521 - 19.428)^2 + (19.655 - 19.428)^2 + (19.210 - 19.428)^2] / (6 - 1)\}^{\frac{1}{2}} / \sqrt{6} = 0.126\,5;$$

蒂巴因:

$$u(A) = S(A)/\sqrt{n} = [\sum_{i=1}^n (A_i - A)^2 / n - 1] \frac{1}{2} / \sqrt{6} =$$
$$\{[(20.670 - 20.415)^2 + (20.012 - 20.415)^2 + (20.389 - 20.415)^2 + (20.433 - 20.415)^2 + (20.566 - 20.415)^2 + (20.421 - 20.415)^2] / (6 - 1)\}^{\frac{1}{2}} / \sqrt{6} = 0.091\,5。$$

重复性相对标准不确定度:

罂粟碱: $u_{rel}(5) = \frac{0.081\,9}{18.528} = 0.004\,42;$

那可丁: $u_{rel}(5) = \frac{0.126\,5}{19.482} = 0.006\,49;$

蒂巴因: $u_{rel}(5) = \frac{0.091\,5}{20.415} = 0.004\,48。$

3.1.6 加标回收率引入的不确定度 按 1.2.3 方法制备加标

表 4 加标样品中罂粟碱、那可丁、蒂巴因残留量						
Table 4 The results of papaverine, narcotine, thebaine residue in add-standard sample						
生物碱	编号	样品质量/ g	样品中含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	加标量/ ng	测得量/ ng	回收率/ %
罂粟碱	1	1.999 7	<8	20.00	18.801	94.01
	2	1.999 2	<8	20.00	18.535	92.68
	3	2.000 8	<8	20.00	18.321	91.61
	4	1.999 4	<8	20.00	18.732	93.66
	5	2.001 4	<8	20.00	18.345	91.73
	6	2.000 7	<8	20.00	18.433	92.17
	平均值	2.000 2	<8	20.00	18.528	92.64
那可丁	1	1.999 7	<8	20.00	19.187	95.94
	2	1.999 2	<8	20.00	19.994	99.97
	3	2.000 8	<8	20.00	19.322	96.61
	4	1.999 4	<8	20.00	19.521	97.61
	5	2.001 4	<8	20.00	19.655	98.28
	6	2.000 7	<8	20.00	19.210	96.05
	平均值	2.000 2	<8	20.00	19.482	97.41
蒂巴因	1	1.999 7	<8	20.00	20.670	103.35
	2	1.999 2	<8	20.00	20.012	100.06
	3	2.000 8	<8	20.00	20.389	101.95
	4	1.999 4	<8	20.00	20.433	102.17
	5	2.001 4	<8	20.00	20.566	102.83
	6	2.000 7	<8	20.00	20.421	102.11
	平均值	2.000 2	<8	20.00	20.415	102.08

供试品,上机测定结果及回收率见表 5,其中罂粟碱、那可丁、蒂巴因回收率的标准偏差分别为 1.002%,1.549%,1.121%。

故,回收率的相对标准不确定度为:

罂粟碱： $u_{rel}(6) = \frac{SD}{R\sqrt{n}} = \frac{0.010\ 02}{0.926\ 4 \times \sqrt{6}} = 0.004\ 42;$

那可丁： $u_{rel}(6) = \frac{SD}{R\sqrt{n}} = \frac{0.015\ 49}{0.974\ 1 \times \sqrt{6}} = 0.006\ 49;$

蒂巴因： $u_{rel}(6) = \frac{SD}{R\sqrt{n}} = \frac{0.011\ 21}{1.020\ 8 \times \sqrt{6}} = 0.004\ 48。$

3.2 总的合成标准不确定度分析

各具体不确定度分量值见表 5。

因此,本试验根据 HPLC-MS/MS 法测定骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因的合成相对标准不确定度为:

表 5 不确定度一览表

Table 5 The list of uncertainty of measurement

生物碱	样品称取量	标准液的配制	进样体积	标准曲线	试验重复性	加标回收率
罂粟碱	0.003 23	0.007 836	0.005 77	0.475	0.004 42	0.004 42
那可丁	0.003 23	0.007 839	0.005 77	0.575	0.006 49	0.006 49
蒂巴因	0.003 23	0.007 839	0.005 77	1.897	0.004 48	0.004 48

罂粟碱： $u_{rel} = \sqrt{u_{rel}^2(1)+u_{rel}^2(2)+u_{rel}^2(3)+u_{rel}^2(4)+u_{rel}^2(5)+u_{rel}^2(6)}$
 $= \sqrt{0.003\ 23^2+0.007\ 836^2+0.005\ 77^2+0.475^2+0.004\ 42^2+0.004\ 42^2}=0.475;$

那可丁： $u_{rel} = \sqrt{u_{rel}^2(1)+u_{rel}^2(2)+u_{rel}^2(3)+u_{rel}^2(4)+u_{rel}^2(5)+u_{rel}^2(6)}$
 $= \sqrt{0.003\ 23^2+0.007\ 839^2+0.005\ 77^2+0.575^2+0.006\ 49^2+0.006\ 49^2}=0.575;$

蒂巴因： $u_{rel} = \sqrt{u_{rel}^2(1)+u_{rel}^2(2)+u_{rel}^2(3)+u_{rel}^2(4)+u_{rel}^2(5)+u_{rel}^2(6)}$
 $= \sqrt{0.003\ 23^2+0.007\ 839^2+0.005\ 77^2+1.897^2+0.004\ 48^2+0.004\ 48^2}=1.897。$

4 结论

本试验分析了液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)测定骨汤宝中罂粟碱、那可丁、蒂巴因的不确定度,结果表明:3 种生物碱的合成相对不确定度分别为 0.475、0.575、1.897;影响罂粟碱、那可丁、蒂巴因残留量测量不确定度的主要因素是标准曲线的拟合,其次是标准液配制、进样体积、试验重复性、回收率以及样品称量。为了保证测定结果的准确性,在日常检测中,应加强对仪器设备的维护保养,使仪器状态稳定,严格控制标准溶液的配制过程,同时加强实验员的标准操作训练,以减小测量结果的不确定度。

参考文献

[1] 庞爱军. 食品中罂粟壳残留的检测[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2009, 21(3): 70-71.

[2] 杨雯莹, 殷耀, 张睿, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定火锅底料中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因等五种非法添加物[J]. 环境化学, 2016, 35(6): 1 321-1 324.

[3] 汪芳芳, 吕亮, 曾爱明, 等. 食品中罂粟壳残留检测的研究现状[J]. 现代商贸工业, 2009, 21(3): 279-280.

[4] 国家食品药品监督管理总局. 关于 35 家餐饮服务单位经营的食品中检出罂粟壳成分的通告(2016 年第 10 号)[EB/OL]. (2016-1-20) [2017-1-11]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/142503.html>.

[5] 赵丹霞, 樊垚, 刘嘉亮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定调料中罂粟壳生物碱含量的不确定度评定[J]. 中国调味品, 2013, 38(7): 87-93.

[6] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 等. 液相色谱-质谱联用技术测定食品中罂粟碱残留[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(7): 130-132.

[7] 刘燕, 陈利国, 彭新凯, 等. 气相色谱法测定果冻中环己基氨基磺酸钠(甜蜜素)结果不确定度评定[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 110-113.

[8] 陈利国, 曹小彦, 谭舸, 等. 气相色谱法测定酱腌菜中甲胺磷农药残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2007, 23(4): 115-118.

[9] 王柯, 郑荣, 简龙海, 等. 火锅调料中 5 种生物碱成分的液相色谱-串联质谱测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2011(2): 363-365.

[10] KASPEREK Regina, ZIMMER Łukasz, SWIADER Katarzyna, et al. Development of spectrophotometric method for simultaneous estimation of diclofenac sodium and papaverine hydrochloride in tablets based on simultaneous equation method[J]. Current Issues in Pharmacy & Medical Sciences, 2012, 25(2): 182-186.

[11] HOLLAND Patrick T, MCNABB Paul, SELWOOD Andrew I, et al. Amnesic shellfish poisoning toxins in shellfish: estimation of uncertainty of measurement for a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method[J]. Journal of Aoac International, 2003, 86(5): 1 095-1 100.

[12] 李慎安. JJF 1059—1999《测量不确定度评定与表示》讨论之十标准偏差的自由度及其估计[J]. 工业计量, 2007, 17(2): 39-40.

[13] 占永革, 龚剑, 黄湘燕. 石墨炉原子吸收法检验猪肝中铅回收率不确定度的评估[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 155-160.

[14] 陈光, 林立. ICP-MS 法测定肉制品中铅含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 57-60.

[15] 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.