

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.05.012

同位素稀释—气质法测定白酒中氨基甲酸乙酯的测量不确定度评定

Evaluation of uncertainty in the determination of ethyl carbamate in Chinese spirits by isotope dilution GC-MS method

王开宇 左惠君 于欣欣 都芸 马燕玲 吴帅

WANG Kai-yu ZUO Hui-jun YU Xin-xin DU Yun MA Yan-ling WU Shuai

(烟台市食品药品检验检测中心, 山东烟台 264000)

(Yantai Testing Center for Food and Drug, Yantai, Shandong 264000, China)

摘要:按照 GB 5009.223—2014《食品安全国家标准 食品中氨基甲酸乙酯的测定》测定白酒中的氨基甲酸乙酯,并依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》评定氨基甲酸乙酯测量结果的不确定度。结果表明,测量结果的不确定度与同位素内标浓度无关,与标准溶液系列定容体积无关,也与样品处理后定容体积无关;内标溶液引入的不确定度分量仅与量取内标液体积有关。白酒中氨基甲酸乙酯含量为 106 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 扩展不确定度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 主要分量与贡献为:测量重复性 60.8%, 标准曲线拟合 18.0%, 标准溶液 16.4%, 样品处理 4.7%, 其中标准溶液和样品处理因移液器容量允差及重复性的不确定度共占 19.4%, 是两种分量的主要来源;其他来源如天平、玻璃量器、温度等可忽略不计。

关键词:白酒;氨基甲酸乙酯;同位素稀释;内标曲线法;不确定度

Abstract: According to GB 5009.223—2014 "National Standard for Food Safety, Determination of Ethyl Carbamate in Foods", the ethyl carbamate in liquor was determined, and the uncertainty of the measuring result was evaluated according to JJF 1059.1—2012 "Measurement Uncertainty Evaluation and Expression". Analysis found that the uncertainty of the measurement results was independent of not only the internal standard concentration of the isotope or the volumetric volume of the standard solution series, but also the volume of the sample after processing. Moreover, the uncertainty component introduced by the internal standard solution only related to the volume of the internal standard liquid. The result of evaluation showed that the content of ethyl carbamate in liquor was

106 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the expanded uncertainty was 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The main components and contributions included measurement repeatability of 60.8%, standard curve fitting of 18.0%, standard solution of 16.4%, and sample processing 4.7%. In these components of uncertainty, the standard solution and sample processing caused by the pipette capacity tolerance and repeatability uncertainty accounted for 19.4%, which was the main source of the two components. Other sources such as balances, glass gauges, temperature, etc. were negligible.

Keywords: Chinese spirits; ethyl carbamate; isotope dilution; internal standard curve method; uncertainty

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, EC)是食品在发酵和贮藏过程中天然产生的污染物,是一种多位点致癌物,可能会导致啮齿类动物皮肤癌、肝癌等疾病的发生^[1]。2007年,世界卫生组织正式将 EC 归为 2A 类致癌物(可能令人类患癌的物质)^[2]。酒精饮料在生产中会产生 EC,尿素、氢氰酸等物质会与乙醇相互作用生成 EC^[3],因此 EC 污染已成为近年来被高度关注的酒类食品安全热点问题之一,已有多个国家和国际组织对其限量进行了规定,日本清酒为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$,法国、德国和瑞士水果白兰地分别为 1 000, 800, 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$,美国佐餐葡萄酒为 15 $\mu\text{g}/\text{L}$,甜葡萄酒为 60 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[4]。目前中国尚未制订食品中 EC 的限量标准,但其风险控制应该得到高度重视^[5]。例如,姚晓洁等^[6]对河南省 1 882 批白酒中 EC 含量进行检测时发现,52.3%的白酒样品中检出了 EC,其中最高含量为 1 680 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均值为 49.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前,国内外对 EC 含量的测定主要有气相色谱—质谱(GC-MS)、高效液相色谱—质谱(HPLC-MS)、高效液相色谱—荧光检测(HPLC-FLD)等方法^[7],中国也发布了检测标准 GB 5009.223—2014《食品安全国家标准 食品

作者简介:王开宇(1970—),男,烟台市食品药品检验检测中心高级工程师。E-mail:2004wangkaiyu@163.com

收稿日期:2020-11-08

中氨基甲酸乙酯的测定》,采用内位素稀释,碱性硅藻土固相萃取,GC-MS检测,其测量不确定度也有报道。但是,包括其他采用内标—标准曲线法的测量不确定度评定普遍存在一些问题,主要是混淆了测量模型与不确定度因素之间的关系,将测量模型中样品定容体积作为不确定度分量进行评定;此外,测量结果与内标液浓度有关,与测量结果有关的不确定度因素未能进行正确分析。

试验拟依据JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》,以食品安全检测标准GB 5009.223—2014为例,评定同位素稀释—标准曲线法的测量不确定度,旨在为分析出影响氨基甲酸乙酯测量结果的主要因素并加以控制,规范内标—标准曲线法的测量不确定度评定。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

氨基甲酸乙酯标准品:美国 AccuStandard 公司;

D5-氨基甲酸乙酯(D5-EC):美国 AccuStandard 公司;

甲醇、正己烷:色谱纯,德国 MERCK 公司;

乙酸乙酯、乙醚:色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

气相色谱—质谱联用仪:7890B-5977B型,美国安捷伦公司;

电子天平:SQP型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

碱性硅藻土固相萃取柱:Cleanert EC 氨基甲酸乙酯专用固相萃取柱,天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.3 试验方法

依据GB 5009.223—2014《食品安全国家标准 食品中氨基甲酸乙酯的测定》。试样中加入D5-氨基甲酸乙酯同位素内标后,经碱性硅藻土固相萃取柱净化、洗脱,浓缩定容,用气相色谱—质谱仪进行测定,标准曲线内标法定量。

1.3.1 标准溶液配制

(1) D5-氨基甲酸乙酯标准溶液:称取0.010 0 g D5-氨基甲酸乙酯于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解定容,得质量浓度为1.00 mg/mL的D5-EC储备液,再用甲醇稀释至2.00 μg/mL的D5-EC使用液,质量浓度可直接记为 $c_{D5}^0 = 2.00 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 氨基甲酸乙酯标准溶液:准确称取0.100 0 g 氨基甲酸乙酯标准品于100 mL容量瓶中,甲醇溶解定容,得质量浓度为1.00 mg/mL的EC储备液;再用甲醇逐级稀释至10.000,0.500 μg/mL的EC中间液。

(3) 混合标准溶液系列:准确吸取0.500 μg/mL的EC中间液20,50,100,200,400 μL和10.0 μg/mL的EC中间液50,100 μL于7个气相用进样瓶中;准确吸取100 μL 2.00 μg/mL的D5-EC使用液添加至各瓶中,用甲

醇补加至1 mL,涡旋混匀,得到质量浓度分别为10.0, 25.0,50.0,100.0,200.0,500.0,1 000.0 ng/mL,含内标 $c_{D5} = 200 \text{ ng/mL}$ 的混合标准溶液。另配制一瓶含内标为200 ng/mL的空白溶液。

1.3.2 样品处理 精确称取2.000 g样品,准确加入2.00 μg/mL的内标D5-EC使用液100 μL,40 °C氮吹至约0.5 mL后补加水至2 mL,加氯化钠0.3 g,混匀后加至碱性硅藻土固相萃取柱上,静置10 min。用10 mL正己烷淋洗后,用10 mL 5%乙酸乙酯—乙醚溶液以约1 mL/min流速进行洗脱,洗脱液经装有2 g无水硫酸钠漏斗脱水后,氮吹至约0.5 mL,用甲醇加至约1 mL,混匀,待气质分析。

1.3.3 气质条件

(1) 气相条件:毛细管色谱柱VF-WAXms,30 m×0.25 mm×0.25 μm;进样口温度220 °C;柱温为初温50 °C保持1 min,以5 °C/min升至180 °C,240 °C后运行5 min;载气为氦气,1 mL/min;不分流进样,进样量1 μL。

(2) 质谱条件:电子轰击源(EI),温度230 °C,70 eV;选择离子监测模式(SIM);选择离子:氨基甲酸乙酯 m/z 44,62,74,89,定量离子62;D5-氨基甲酸乙酯 m/z 64,76,定量离子64。

1.3.4 进样分析 内标空白溶液进样1次,内标空白溶液中不含目标物氨基甲酸乙酯,不干扰样品检测。标准溶液每浓度进样2次,计算EC与D5-EC峰面积之比,以峰面积之比为纵坐标,EC浓度为横坐标,绘制标准曲线。样品每平行样进样2次,以峰面积之比平均值从标准曲线计算溶液中EC浓度。

1.3.5 数学模型的建立 根据测量原理和方法,按式(1)计算白酒中氨基甲酸乙酯含量。

$$X = \frac{c \times V}{m} \times \frac{1}{R}, \quad (1)$$

式中:

X ——样品中氨基甲酸乙酯含量,μg/kg;

c ——样品溶液中氨基甲酸乙酯质量浓度,ng/mL;

V ——样品处理后定容体积,mL;

m ——样品质量,g;

R ——回收率,取1。

2 结果与分析

2.1 测量不确定度分析

根据内标校准法原理,目标物与内标浓度之比正比于峰面积之比,即 $\frac{c_s}{c_{D5}} \propto \frac{A_s}{A_{D5}}$ 。

对于混合标准溶液:

$$\frac{c_s}{c_{D5}} = \frac{m_s/V}{m_{D5}/V} = \frac{m_s}{m_{D5}} = \frac{c_{s\text{中}} \times V_{s\text{中}}}{c_{D5}^0 \times V_{D5}} \quad (2)$$

内标浓度因在混合标准溶液和样品溶液中相同而抵

消,测量结果与内标浓度无关,不必评定内标浓度的不确定度,但需评定加入内标使用液 c_{b5} 体积引入的不确定度^[8-9]。

由式(2)可知,标准溶液中目标物与内标浓度之比与定容体积无关,仅与溶液中目标物与内标质量之比有关,样品溶液亦如此,不必评定定容体积的不确定度^[9-10]。

因此,测量结果 X 的不确定度分量:测量重复性 s 、样品溶液浓度 c 、样品质量 m 和回收率 R ;样品溶液浓度 c 的不确定度分量有混合标准溶液、曲线拟合及样品中加入内标使用液体积。

测量不确定度模型: $X(u) = F_u[s, c, m, R]$ 。

其中样品溶液浓度 c 的不确定度模型为:

$c(u) = F_u'[c_s, u(\text{曲线拟合}), V_{\text{vis}}] = F_u'[(c_{s\text{中}}, V_{s\text{中}}, V_{\text{is}}), u(\text{曲线拟合}), V_{\text{vis}}]$ 。

具体不确定度来源因果图见图 1。

2.2 测量不确定度评定

2.2.1 测量重复性不确定度 u_{rA} 样品平行 6 次,其测量结果见表 1。

测量重复性不确定度为测量结果平均值的标准偏差,为 A 类标准不确定度,采用 A 类评定^[11]。

根据表 1,测量结果标准偏差 $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - 106.3)^2}{n - 1}} = 9.35 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

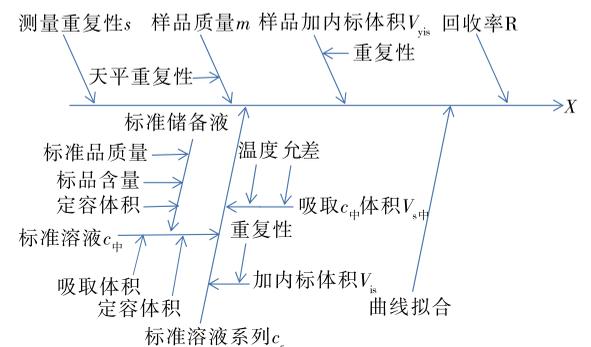


图 1 不确定度因果图

Figure 1 Causal relationship diagram of uncertainty

表 1 样品测量结果

Table 1 Result of sample measurement

序号	样品质量/ g	溶液质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	EC 含量/ (μg · kg ⁻¹)
1	2.036	231.7	113.8
2	2.152	233.1	108.3
3	2.091	242.5	116.0
4	2.067	193.1	93.4
5	2.205	242.7	110.1
6	2.118	203.7	96.2
平均值	2.112	224.5	106.3

A 类标准不确定度: $u_A = S_s = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{9.35}{\sqrt{6}} = 3.82 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

A 类相对标准不确定度: $u_{rA} = \frac{u_A}{x} = \frac{3.82}{106} = 0.0360$ 。

2.2.2 混合标准溶液 c_s 的不确定度 混合标准溶液由标准中间液和内标使用溶液配制,需依次评定标准储备液、标准中间液和吸取溶液体积的不确定度。

(1) EC 标准储备溶液的不确定度

① 标准品称量质量 m_s 的不确定度:标准品称量质量 0.103 5 g,因质量较小,质量不确定度仅由天平重复性引入^[12]。天平检定证书显示天平重复性为 0.2 mg,根据 JJG 1036—2008《电子天平检定规程》,天平重复性为 6 次检定称量质量的极差,按极差法求得重复性标准偏差,6 次极差系数 $C=2.53$,去皮法称量 2 次,则质量 m_s 的相对不确定度:

$u_r(m_s) = \frac{u(m_s)}{m} = \frac{\sqrt{\left(\frac{0.2}{2.53}\right)^2 \times 2}}{0.1035 \times 1000} = 0.00108$ 。

② 质量分数 P 的不确定度:氨基甲酸乙酯标准品质量分数 P 为 99.5%,误差为 ±0.5%,服从均匀分布,相对不确定度:

$u_r(P) = \frac{0.5\%}{\sqrt{3} \times 99.5\%} = 0.00290$ 。

③ 定容体积 V_1 (100 mL) 的不确定度:由 100 mL 容量瓶体积允差和温度波动引入,100 mL A 级容量瓶容量允差 ±0.10 mL^[13],假设为均匀分布, $u_{r1}(V_1) = \frac{0.10}{\sqrt{3} \times 100} = 0.000577$;温度为 (20 ± 2) °C,甲醇体胀系数 0.001 2,温度波动 2 °C,假设为均匀分布, $u_{r2}(V_1) = \frac{2 \times 0.0012}{\sqrt{3}} = 0.00139$;合成的体积相对不确定度^[14]:

$u_r(V_1) = \sqrt{0.000577^2 + 0.00139^2} = 0.00150$ 。

EC 标准储备溶液相对不确定度由标准品称量质量、质量分数、定容体积不确定度合成:

$u_r(c_{\text{储}}) = \sqrt{[u_r(m)]^2 + [u_r(P)]^2 + [u_r(V_1)]^2} = \sqrt{0.00108^2 + 0.00290^2 + 0.00150^2} = 0.00344$ 。

(2) EC 中间液 $c_{\text{中}1}$ (10.0 μg/mL) 和 $c_{\text{中}2}$ (0.50 μg/mL) 的不确定度:量取 1.00 mL EC 储备液,甲醇定容于 100 mL,制得 EC 中间液 $c_{\text{中}1}$ (10.30 μg/mL);再量取 5.00 mL EC 中间液 $c_{\text{中}1}$,甲醇定容于 100 mL,制得 EC 中间液 $c_{\text{中}2}$ (0.515 μg/mL)。

配制中间液及混合标准溶液温度为 (24 ± 2) °C,温度引入的不确定度在配制混合标准溶液时合并评定^[15]。

① 吸取储备液体积 1.00 mL (V_2) 的不确定度: A 级 1.00 mL 单标吸量管,容量允差 ±0.007 mL,按均匀分布,相对不确定度:

$$u_r(V_2) = \frac{0.007}{\sqrt{3} \times 1.00} = 0.004\ 04。$$

② 吸取中间液 $c_{\text{中}1}$ 5.00 mL(V_3)的不确定度:A级 5.00 mL 单标吸量管,容量允差±0.015 mL,按均匀分布,相对不确定度:

$$u_r(V_3) = \frac{0.015}{\sqrt{3} \times 5.00} = 0.001\ 73。$$

③ 定容体积 100 mL(V_4)的不确定度:100 mL 容量瓶均为 A 级,相对不确定度同 $u_{r1}(V_1)$,即 $u_r(V_4) = u_{r1}(V) = 0.000\ 577$ 。

④ EC 中间液 $c_{\text{中}1}$ (10.30 μg/mL)的相对不确定度:

$$u_r(c_{\text{中}1}) = \sqrt{[u_r(c_{\text{储}})]^2 + [u_r(V_2)]^2 + [u_r(V_4)]^2} = \sqrt{0.003\ 44^2 + 0.004\ 04^2 + 0.000\ 577^2} = 0.005\ 34;$$

EC 中间液 $c_{\text{中}2}$ (0.50 μg/mL)的相对不确定度:

$$u_r(c_{\text{中}2}) = \sqrt{[u_r(c_{\text{中}1})]^2 + [u_r(V_3)]^2 + [u_r(V_4)]^2} = \sqrt{0.005\ 34^2 + 0.001\ 73^2 + 0.000\ 577^2} = 0.005\ 64。$$

(3) 混合标准溶液的不确定度评定:混合标准溶液的不确定度来源为 EC 中间液、吸取 EC 中间液体积及吸取 D5-EC 内标使用液体积。

① 吸取 D5-EC 内标使用液体积 100 μL(V_{is})的不确

$$u_r(V_{st}) = \sqrt{\left[\frac{(\beta - \beta_{\text{移}}) \times \Delta t_1}{k}\right]^2 + \left[\frac{(\beta - \beta_{\text{移}}) \times \Delta t_2}{k}\right]^2} = \sqrt{\left[\frac{(1.2 \times 10^{-2} - 0.000\ 45) \times 4}{\sqrt{3}}\right]^2 + \left[\frac{(1.2 \times 10^{-2} - 0.000\ 45) \times 2}{\sqrt{3}}\right]^2} = 0.001\ 94。$$

④ 各混合标准溶液浓度的相对不确定度:标准溶液系列各浓度不确定度由 EC 中间液不确定度、吸取体积不确定度(包含温度的不确定度)、吸取内标液体积不确定度引入,按式(3)计算。

$$u_r(c_i) = \frac{\sum [u_r(c_i)]^2}{n} = \sqrt{\frac{0.025\ 8^2 + 0.020\ 7^2 + 0.016\ 2^2 + 0.014\ 3^2 + 0.012\ 8^2 + 0.020\ 6^2 + 0.016\ 1^2}{7}} = 0.018\ 7。$$

2.2.3 曲线拟合的不确定度 混合标准溶液各浓度测定 2 次,以平均值计算标准曲线。标准溶液系列测量结果及

定度:因在混标和样品中 D5-EC 内标使用同一支移液器吸取相同体积 100 μL,体积不确定度由移液器测量重复性引入。查 JJG 646—2006《移液器标准》,100 μL 测量重复性为 1.0%,可直接引用, $u_r(V_{is}) = 1.0\% = 0.010$ 。

② 吸取 EC 中间液体积($V_{\text{中}}$)的不确定度:由移液器体积容量允差 ΔV (容量允差见 JJG 646—2006《移液器》)引入,按均匀分布计算:

$$u_r(V_{\text{中}}) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}}。 \tag{2}$$

③ 温度对吸取 EC 中间液的不确定度 $u_r(V_{st})$:EC 储备液在 20 °C 配制,中间液和混合标准溶液在 (24 ± 2) °C 配制。温度升高导致溶液浓度降低,而移液器(移液枪)因温度升高导致其体积增大,可吸入更多的溶液。温度引入的不确定度由甲醇体胀系数、移液器体胀系数、温度差及温度波动共同作用;甲醇体胀系数 $\beta = 1.2 \times 10^{-3} \text{ °C}^{-1}$,移液器体胀系数 $\beta_{\text{移}} = 0.000\ 45 \text{ °C}^{-1}$ [16],温度差 $\Delta t_1 = 24 - 20 = 4 \text{ °C}$,温度波动半宽 $\Delta t_2 = 2 \text{ °C}$;温度差 Δt_1 引入体积的系统误差,将其按均匀分布处理成系统不确定度,温度波动 Δt_2 假设为均匀分布,则温度引入的相对不确定度为:

$$\sqrt{[u_r(c_{\text{中}})]^2 + [u_r(V_s)]^2 + [u_r(V_{st})]^2 + [u_r(V_{is})]^2}。 \tag{3}$$

经计算各浓度不确定度见表 2。

⑤ 混合标准溶液系列的不确定度:以标准溶液系列的各相对不确定度的均方根作为混合标准溶液系列的不确定度[17]。

相关数值见表 3。

经计算:曲线方程 $A_B = ac + b = 0.005\ 788c - 0.020\ 41$,

表 2 混合标准溶液各浓度的相对不确定度

Table 2 Relative uncertainty of each concentration of mixed standard solution

标准品质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	不确定度来源				标准溶液不确定度 $u_r(c_i)$ (由 u_1, u_2, u_3, u_4 合成)
	EC 中间液 u_1	吸取体积/μL	容量允差/不确定度 u_2	温度因素 u_3 内标液不确定度 u_4	
10.3	0.005 64	20	±4.0%/0.023 1	0.010	0.025 9
25.75	0.005 64	50	±3.0%/0.017 3	0.010	0.020 9
51.5	0.005 64	100	±2.0%/0.011 5	0.010	0.016 4
103	0.005 64	200	±1.5%/0.008 7	0.001 94	0.014 5
206	0.005 64	400	±1.0%/0.005 8	0.010	0.013 0
515	0.005 34	50	±3.0%/0.017 3	0.010	0.020 8
1 030	0.005 34	100	±2.0%/0.011 5	0.010	0.016 3

表 3 标准溶液系列测量结果
Table 3 Result of standard solution measurement

EC 质量浓度 $c_s / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	峰面积比值 A_B	EC 峰面积 A_s	D5-EC 峰面积 A_{D5}	$A_B - (ac + b)$	$c - \bar{c}$
10.3	0.062 47	1 681	26 910	0.023 26	-267.06
	0.062 97	1 715	27 236	0.023 76	-267.06
25.75	0.148 24	4 359	29 405	0.019 61	-251.61
	0.147 05	4 306	29 283	0.018 42	-251.61
51.5	0.288 27	8 459	29 344	0.010 60	-225.86
	0.287 37	8 505	29 596	0.009 70	-225.86
103	0.580 3	17 143	29 540	0.004 5	-174.36
	0.581 6	17 237	29 637	0.005 8	-174.36
206	1.142 1	33 295	29 152	-0.029 8	-71.36
	1.134 5	33 364	29 408	-0.037 4	-71.36
515	2.896 7	84 896	29 308	-0.063 7	237.64
	2.907 9	84 837	29 175	-0.052 5	237.64
1 030	5.981 9	177 214	29 625	0.040 7	752.64
	5.969 5	178 166	29 846	0.028 3	752.64

$$s(A_r) = \sqrt{\frac{\sum [A_{B_i} - (ac_i + b)]^2}{mn - 2}} = 0.033\ 73,$$

标准溶液浓度平均值 $\bar{c} = 277.36\ \text{ng/mL}$, $\sum (c_i - \bar{c})^2 = 1\ 688\ 150$ 。

样品溶液浓度由拟合曲线引入的不确定度为^[18]:

$$u(c_{\text{测}}) = \frac{s(A_r)}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(c - \bar{c}_i)^2}{\sum (c_i - \bar{c}_i)^2}}, \quad (4)$$

式中:

$s(A_r)$ ——标准曲线峰面积比残差;

a ——标准曲线的斜率;

P ——样品溶液的测量次数;

N ——标准溶液总测量次数;

c ——样品溶液 EC 质量浓度平均值, ng/mL ;

\bar{c}_i ——标准溶液浓度的平均值, ng/mL 。

将 $s(A_r) = 0.033\ 73$, $a = 0.005\ 788$, $P = 2$ ^[19], $N =$

$7 \times 2 = 14$, $c = 224.5\ \text{ng/mL}$, $\bar{c}_i = 277.36\ \text{ng/mL}$, 代入式(3)得 $u(c_{\text{测}}) = 4.41\ \text{ng/mL}$, 则相对不确定度 $u_r(c_{\text{测}}) = \frac{4.41}{224.5} = 0.019\ 6$ 。

2.2.4 样品中加入内标使用液体积 V_{vis} 的不确定度 内标使用液体积 $100\ \mu\text{L}$ 的不确定为移液器测量重复性, $u_r(V_{\text{vis}}) = 0.010$ 。

2.2.5 样品质量 m 的不确定度 样品质量 $m = 2.112\ \text{g}$, 使用 $0.001\ \text{g}$ 电子天平。天平检定合格, 检定证书显示天平示值误差 $E = 0\ \text{mg}$, 重复性 $m_{\text{重}} = 0\ \text{mg}$, 则不确定度仅由天平分辨率 $d = 0.001\ \text{g}$ 引入, 质量称量两次, 质量 m 的相对不确定度^[12]:

$$u_r(m) = \frac{u(m)}{m} = \sqrt{\frac{\left(\frac{0.001}{2\sqrt{3}}\right)^2 \times 2}{2.112}} = 0.000\ 19。$$

2.2.6 回收率 R 引入的不确定度 采用样品加标的方法测量样品处理回收率。称量 $2\ \text{g}$ 样品, 准确加入 $200\ \mu\text{L}$ $0.515\ \mu\text{g/mL}$ 的 EC 中间液 2, 混匀后按 1.3.2 处理。回收率重复测量 6 次, 结果见表 4。

表 4 中,

$$c_{\text{加}} = \frac{c_{\text{中}2} \times V_R}{m_R}, \quad (5)$$

$$R = \frac{X_R - X}{c_{\text{加}}} \times 100\%。 \quad (6)$$

平均回收率 R 的不确定度来源有回收率平均值的标准偏差和加标浓度两部分^[20]。

(1) 回收率平均值的标准偏差:

$$s(R) = \frac{8.29\%}{\sqrt{6}} = \frac{8.29\%}{\sqrt{6}} = 3.38\%。$$

(2) 加标浓度引入的不确定度 $u_r(c_{\text{加}})$: 根据式(4), 加标浓度的不确定度分量有 EC 中间液 2 浓度、吸取体积、样品质量 3 部分。因 EC 中间液 2 浓度不确定度包含在校准标准溶液中, 不必重复评定, 只需评定吸取体积、样品质量的不确定度。

① 吸取体积 $200\ \mu\text{L}$, 容量允差按均匀分布计算:

$$u_r(V_{\text{加}}) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} = \frac{1.5\%}{\sqrt{3}} = 0.008\ 66。$$

② 样品质量 m : 参照 2.2.5, $u_r(m_R) = \frac{u(m_R)}{m_R} =$

$$\sqrt{\frac{\left(\frac{0.001}{2\sqrt{3}}\right)^2 \times 2}{2.059}} = 0.000\ 20。$$

表 4 回收率测量结果
Table 4 Result of recovery

序号	样品质量 m_R/g	加标浓度 $c_{加}/(\mu g \cdot kg^{-1})$	$X_R/(\mu g \cdot kg^{-1})$	回收率 $R/\%$
1	2.125	48.5	152.6	95.5
2	2.008	51.3	163.6	111.7
3	2.091	49.3	157.5	103.9
4	1.946	52.9	166.2	113.2
5	2.042	50.4	153.8	94.2
6	2.143	48.1	153.2	97.5
平均值	2.059			102.7
标准偏差				8.29

③ 合成得 $u_r(c_{加}) = \sqrt{0.008\ 66^2 + 0.000\ 20^2} = 0.008\ 66$,
 $u(c_{加}) = 0.008\ 66 \times 102.7\% = 0.89\%$ 。

(3) 合成回收率 R 的不确定度: $u_c(R) = \sqrt{s^2(R) + u^2(c_{加})} = \sqrt{3.38\%^2 + 0.89\%^2} = 3.50\%$ 。

(4) 显著性检验:采用实测 T 值与 k (包含因子)比较的方法, $T < k$, 说明实测回收率与 1 没有差别。经计算, $T = \frac{|1-R|}{u(R)} = \frac{|1-102.7\%|}{3.50\%} = 0.77$, $T < k = 2^{[21]}$, 说明回收率与 1 没有差别, 检测结果不必校正回收率, 也不必评定回收率的不确定度。

2.2.7 合成标准不确定度 不确定度分量中测量结果重复性 u_{rA} 、标准溶液浓度 $u_r(c_s)$ 、曲线拟合 $u_r(c)$ 、样品中加入内标 $u_r(V_{vis})$ (此 3 项合成得样品溶液浓度 c 的不确定度)、样品质量 $u_r(m)$ 均认为相互独立, 合成得相对标准不确定度:

$$u_{rc} = \sqrt{u_{rA}^2 + [u(c_s)]^2 + [u(c_{加})]^2 + [u_r(V_{vis})]^2 + [u_r(m)]^2} =$$

$$\sqrt{0.036\ 0^2 + 0.018\ 7^2 + 0.019\ 6^2 + 0.010^2 + 0.000\ 19^2} = 0.046\ 2;$$

标准不确定度: $u_c = 0.046\ 2 \times 106 = 4.90\ \mu g/kg$ 。

标准不确定度主要来源见表 5。

2.3 扩展不确定度评定

取包含因子 $k = 2$, 扩展不确定度 $U = k \times u_c = 2 \times 4.90 = 9.80 \approx 10\ \mu g/kg$ 。

故白酒中氨基甲酸乙酯含量为 $(106 \pm 10)\ \mu g/kg$, $k = 2$ 。

2.4 影响因素分析

2.4.1 内标液质量浓度 使用同一份内标 D5-EC 使用液 (2.00 $\mu g/mL$), 质量浓度及其不确定度与测量结果无关, 因此在 D5-EC 标准品称量、定容、稀释等过程不必严格操作^[8-9], 但在加入标准品、样品中量取体积应准确。在计算中或色谱软件中可直接以 $c_{D5} = 200\ ng/mL$ 计算。内标选择的原则是不得含有待测目标物, 内标浓度应使内标信号强度适当, 与目标物信号比例匹配。

表 5 标准不确定度来源

Table 5 Source of standard uncertainty

不确定度来源	单位	测量值	相对不确定度	主要贡献/%
测量重复性(A类)	$\mu g/kg$	106	0.036 0	60.85
标准溶液系列	/	/	0.018 7	16.42
标准储备液	mg/mL	103.0	0.003 44	0.56
标准中间液配制	/	/	/	0.94
混标吸取中间液体积允差	μL	20~400	0.005 8~0.023 1	10.05
温度	/	/	0.001 94	0.18
内标液吸取体积	μL	100	0.010 0	4.70
曲线拟合	ng/mL	224.5	0.019 6	18.04
样品中加入内标体积	μL	100	0.010 0	4.70
样品质量	g	2.112	0.000 19	0.002
标准不确定度	$\mu g/kg$	106	0.046 2	100.00

2.4.2 定容体积 根据式(2),混合溶液中质量浓度之比 c_s/c_{D6} 实际上是溶液中标准品与内标质量之比,与定容体积无关,因此所有混合溶液中均无需评定定容体积的不确定度^[9-10]。混标可直接在气相用进样瓶中配制,体积不必准确。

2.4.3 温度 温度影响体积。既有温度不是定标温度 20℃ 的影响,也有温度波动的影响;既有溶液体胀的影响,也有体积量器体胀系数的影响。玻璃量器体胀比溶液小得多,可忽略,但移液枪体胀系数不能忽略,特别是在混合标准溶液配制中需综合评定溶液和移液枪的体胀、温度对体积影响的不确定度。实际评定中,温度引入的不确定度(配制 EC 储备液及混标温度贡献仅占 0.3%)较移液器体积允差(贡献占 10.0%)小得多,亦可忽略不计。因此当检验室温度稳定,没有剧烈波动,试剂和溶液与检验室温度平衡时,温度引入的不确定度基本可以忽略。

2.4.4 回收率 同位素内标物与目标物具有非常相似的物理化学性质,在样品前处理或色谱响应上均表现出一致的特性,内标法加标回收率与 1(100%回收)之间不会存在显著性差异^[22],从评定中也可发现加标回收率与 1(100%回收)之间不存在显著性差异,对大多数内标法不必用样品加标法检验回收率。

3 结论

同位素内标法可自动校正进样体积、混合溶液定容体积的偏差,加标回收率基本可达到 100%,这使得同位素内标法的重复性和准确性都要优于外标法。经评定,白酒中氨基甲酸乙酯测量结果为 $(106 \pm 10) \mu\text{g}/\text{kg}$, $k=2$ 。主要的不确定度分量有:测量结果重复性(A类不确定度)、标准溶液浓度、曲线拟合及样品加内标液体积,其对测量不确定度的贡献分别为 60.8%, 16.4%, 18.0%, 4.7%。其中,标准溶液浓度和样品加内标液不确定度主要来源于所用移液器体积误差和重复性偏差,引入的不确定度合计贡献 19.4%,占比高达 92%。因此在日常检验中要特别加强移液枪类的计量检定和计量管理,尽量选用 100 μL 以上的体积,或者引用实际校准的容量误差,以降低其引入的不确定度。其他来源如质量、玻璃量器、温度等可忽略。可从增加平行样品检测次数、增加样品溶液进样次数以及减小曲线拟合的不确定度来提高检测准确度。

参考文献

- [1] 洪冰,胡婷婷,郑婷婷,等. 氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 农产品加工, 2018(10): 65-68.
- [2] 崔霞,苗虹,赵云峰,等. 发酵食品中氨基甲酸乙酯污染及其毒性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(9): 2 617-2 622.
- [3] 林宜锦,欧梦莹,关统伟,等. 酿造酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 358-364.
- [4] 肖泳,邓放明. 发酵食品中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(3): 216-221.
- [5] 陈小萍,林国斌,林升清,等. 蒸馏酒和发酵酒中氨基甲酸乙酯的监测与危害控制[J]. 海峡预防医学杂志, 2019, 15(6): 54-55.
- [6] 姚晓洁,谷瑞丽,姬建生,等. 白酒中氨基甲酸乙酯含量检测及在不同香型白酒中的含量分析[J]. 食品安全导刊, 2019(18): 136-138.
- [7] 李曼丽. 氨基甲酸乙酯的分析方法的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 1-2.
- [8] 刘佳,毛新武,王成龙,等. 气相色谱—三重四极杆质谱法测定蔬菜中氟虫腈残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(1): 74-80.
- [9] 刘柱,徐潇颖,赵超群,等. 同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量的不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 206-214.
- [10] 李杰,于瑞祥,许卓妮,等. 同位素稀释—气相色谱—质谱法测定发酵乳中氨基甲酸乙酯[J]. 质谱学报, 2015, 36(3): 268-273.
- [11] 欧阳丽,汪辉,何翊,等. UPLC-MS/MS 测定猪肝中五氯酚残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 84-88.
- [12] 李慎安. 电子天平称量不确定度[J]. 工业计量, 2009, 19(1): 47-48.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局. 玻璃量器: JJF 196—2006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [14] 康志娇,赵志友,袁河,等. 原子吸收分光光度计测定槟榔中钙元素含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 107-110.
- [15] 闻向东,曹宏燕. 分析测试液中溶液体积测量的不确定度评定[J]. 理化检验(化学分册), 2009, 45(1): 42-45.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局. 移液器: JJG 646—2006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [17] 中国合格评定国家认可委员会. 石油石化领域理化检测测量不确定度评估指南及实例: CNAS-GL16: 2018[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2018: 26.
- [18] 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.
- [19] 宁霄,金绍明,梁瑞强,等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定猪肉中 β -受体激动剂残留量的不确定度分析[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 315-320.
- [20] 刘庆,万力,王新平,等. 如何评估回收率测量结果不确定度[J]. 中国测试, 2015, 41(增刊 1): 82-84.
- [21] 卢晓华. 标准物质在化学测量结果不确定度评定中的应用举例[J]. 中国计量, 2008(1): 68-69.
- [22] 陈岚,张磊. 同位素稀释气相色谱质谱联用(GC-MS)测定鱼中指示性多氯联苯的不确定度评定[J]. 预防医学情报杂志, 2016, 32(9): 984-988.