DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.08.015

LC-MS/MS 法测定火锅食品中 5 种罂粟壳生物碱的不确定度评定

Evaluation of the uncertainty in the determination of five papaver nudicaule alkaloids from hot pot food by LC-MS/MS

卫星华 李小红 董曼曼

WEI Xing-hua LI Xiao-hong DONG Man-man

孙 晓 张荻悦 张亚锋

SUN Xiao ZHANG Di-yue ZHANG Ya-feng

(西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054)

(Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

摘要:依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和 CNAS—GL06—2019《化学分析中不确定度的评估指南》中不确定度评定的基本程序,通过建立数学模型,建立了高效液相色谱串联质谱法测定火锅食品中吗啡、可待因、罂粟碱、那可丁和蒂巴因含量不确定度的分析方法。结果表明,罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡、可待因合成标准不确定度的最终结果分别为 5.1×10^{-2} , 5.0×10^{-2} , 5.8×10^{-2} , 8.4×10^{-2} , 8.5×10^{-2} ;影响测量结果不确定度的主要因素是样品回收率,样品平行试验重复性,样品提取,校准曲线拟合,标准工作溶液的配制。从校准曲线拟合这一不确定度分量可以看出,采用内标法进行测定的吗啡和可待因明显优于外标法测量的其他 3 种物质,可通过内标法进行测定,以降低样品基质不同所引入的不确定度。

关键词:不确定度;吗啡;可待因;罂粟碱;那可丁;蒂巴因;液质联用;火锅食品

Abstract: According to the procedure for uncertainty assessment described in JJF 1059.1—2012 “Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement” and CNAS—GL06—2019 “Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis”, a mathematical model was established, and an analytical method for the determination of uncertainty of morphine, codeine, pa-

paverine, narcotine and thebaine in chafing dish food by LC-MS/MS was established. The results showed that the synthesis of relative standard uncertainty for papaverine, narcotine, thebaine, morphine and codeine were 5.1×10^{-2} , 5.0×10^{-2} , 5.8×10^{-2} , 8.4×10^{-2} , and 8.5×10^{-2} , respectively; the main factors affecting the uncertainty of measurement results included the sample recovery rate, the repeatability of parallel experiments, sample extraction, calibration curve fitting, and the configuration of standard working solution. From the uncertainty component of calibration curve fitting, it was revealed that morphine and codeine determined by the internal standard method were obviously superior to the other three substances measured by the external standard method. Consequently, using the internal standard method could reduce the uncertainty caused by different sample matrices.

Keywords: uncertainty; morphine; codeine; papaverine; noscapine; thebaine; UPLC/MS/MS; hot pot food

罂粟壳是植物罂粟的干燥成熟果壳,其含有多种生物碱类物质,加入食品中会使人觉得更加美味,然而长期食用添加了罂粟壳的食品,会使人成瘾,给身体造成一定的损害,甚至导致死亡^[1]。目前罂粟壳已被卫生部列入食品中可能违法添加的非食用物质名单中,禁止添加于火锅底料及小吃类食品中,并针对其含有的 5 种主要生物碱成分制定了相关的检验标准^[2]。

在测量及评定过程中往往存在各种各样的影响因素^[3-5],不但影响测评结果,也影响与之相关的司法裁决、行政决定、仲裁结果等评判的正确性^[6]。研究参照相关标准^[7-9],通过建立数学模型,对火锅食品中 5 种罂粟

基金项目:陕西省科技厅科技统筹创新工程计划项目(编号:2014FWPT-01)

作者简介:卫星华,女,西安市食品药品检验所工程师,硕士。

通信作者:张亚锋(1978—),男,西安市食品药品检验所副主任药师,硕士。E-mail: yafeng@163.com

收稿日期:2019-04-15

壳生物碱含量的不确定度来源进行讨论,以期为该检测方法及其结果的准确度提供数据支持,并为实验室质量控制及其他非法添加的检测提供不确定度评定的参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

火锅底料:市售抽检样品;

乙腈:色谱纯,德国 Merck 公司;

甲酸、甲酸铵、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;

试验用水为超纯水;

吗啡标准品:99.8%,中国药品生物制品检定所;

盐酸罂粟碱标准品:99.9%,德国 Sigma-Aldrich 公司;

蒂巴因标准品:100%,中国药品生物制品检定所;

可待因标准品(液标):99.88%,德国 Sigma-Aldrich 公司;

那可丁标准品:100%,中国药品生物制品检定所;

吗啡-D3 标准品、可待因-D3 标准品(液标):100%,上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

液相色谱-质谱联用仪:Agilent 1200 型液相色谱仪,Agilent 6410B Triple Quad LC/MS 型三重串联四极杆质谱仪,配 ESI 离子源及 MassHunter 数据处理软件,美国 Agilent 公司;

电子分析天平:ME204E 及 MS105 型,美国 Mettler Toledo 集团公司;

纯化水机:Milli-Q 型,密理博中国有限公司;

超声波清洗器:KQ-700VDB 型,昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制 分别准确称取标准品适量,用含 0.5%甲酸的甲醇溶液配成罂粟碱、那可丁、蒂巴因和吗啡含量均为 1 mg/mL 的标准储备溶液。吗啡-D3、可待

因-D3 和可待因均为液标,直接作为标准储备液使用。分别准确吸取罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准储备液各 1 mL,吗啡、可待因标准储备液各 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,混匀,即得含罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和吗啡、可待因浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准品溶液。

吸取上述混合标准品溶液 5,2,1 mL,内标标准储备液 0.2 mL,用乙腈分别定容至 10 mL 容量瓶中。另吸取上述混合标准品溶液 1 mL,用乙腈定容至 10 mL 容量瓶中,作为中间标准品溶液,吸取中间标准品溶液 0.1,0.2,0.3,0.5 mL,内标标准储备液 0.2 mL,用乙腈分别定容至 10 mL 容量瓶中。得到罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 0.4,0.8,1.2,2.4,8,20 ng/mL,吗啡、可待因浓度为 2,4,6,10,20,40,100 ng/mL 的系列标准工作溶液,内标溶液浓度均为 40 ng/mL。

1.3.2 样品处理方法 称取 2 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 0.3 mL 内标标准储备液,加入 5 mL 水。涡旋 30 s,准确加入 15 mL 乙腈,涡旋 1 min,超声 30 min,加入 6 g 无水硫酸镁和 1.5 g 无水醋酸钠,立即涡旋 2 min,以 6 000 r/min 离心 5 min,取上清液,过 0.22 μm 滤膜作为待测样品。

1.3.3 色谱条件 流动相:A 相为乙腈,B 相为含 0.1%甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵溶液,按 0.0~0.3 min,90% A;0.3~1.0 min,90%~75% A;1.0~3.5 min,75% A;3.5~4.0 min,75%~90% A;4.0~7.0 min,90% A 进行梯度洗脱。色谱柱:Shiseido Capcell Pak C₁₈ MG III,2.0 mm $\times$ 150 mm,5 μm ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.3 mL/min;进样体积:5 μL ;离子化方式:电喷雾电离;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);5 种目标化合物的质谱条件详见表 1。

1.4 数据处理

将系列标准工作溶液及经处理后的样品进样,罂粟碱、那可丁和蒂巴因采用外标法定量,吗啡和可待因为内

表 1 5 种目标化合物及 2 种内标的质谱条件[†]

Table 1 Mass spectrometry conditions of 5 target compounds and 2 internal standards

名称	离子信息(m/z)	裂解电压/V	碰撞能量/eV
罂粟碱	母离子:340.1;子离子:171.1*,202.1	120	40
那可定	母离子:414.1;子离子:220.0*,353.0	135	30
蒂巴因	母离子:312.4;子离子:58.2*,251.1	120	30
吗啡	母离子:286.1;子离子:165.0*,181.1	135	40
可待因	母离子:300.4;子离子:165.0*,215.1	120	35
可待因-D3	母离子:303.0;子离子:165.0*,215.0	70	35
吗啡-D3	母离子:288.9;子离子:164.5*,152.7	135	50

[†] * 为定量离子。

标法定量,绘制标准工作曲线,将所得样品数据带入曲线,计算得到样品中5种物质的含量。

2 结果与分析

2.1 建立数学模型

根据模型建立原理及检测过程,计算火锅食品中5种罂粟壳生物碱的含量,罂粟碱、那可丁、蒂巴因采用外标法定量,可待因和吗啡采用内标法定量,样品含量按式(1)计算。

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

式中:

X ——试样中5种生物碱的含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

c ——试样溶液中5种生物碱的浓度, $\mu\text{g}/\text{L}$;

V ——定容体积, mL ;

$$U_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}(m_{\text{标}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{标}})^2 + u_{\text{rel}}(C_{\text{标曲}})^2 + u_{\text{rel}}(m_{\text{样}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{样}})^2 + u_{\text{rel}}(f)^2 + u_{\text{rel}}(f_{\text{液质}})^2 + u_{\text{rel}}(r)^2}. \quad (2)$$

2.3 各不确定度分量的分析与计算

2.3.1 标准系列溶液配制过程所引入的不确定度

(1) 标准物质称量引入的不确定度:采用十万分之一天平,根据检定证书,影响其不确定度的主因素及相关分量的标准不确定度计算结果如表2所示。由于标准物质证书未给出其误差范围,故在计算中可忽略。

表2 天平($d=0.01\text{ mg}$)称量引入的不确定度

Table 2 Standard uncertainty of balance ($d=0.01\text{ mg}$) measurement

不确定度分量	允差/ mg	区间半宽/ mg	k 值	标准不确定度/ g
示值误差 $u(m_1)$	± 0.05	0.05	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-5}
分辨力 $u(m_2)$	0.01	0.005	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-6}
重复性 $u(m_3)$	0.15	0.075	$\sqrt{3}$	4.33×10^{-5}
偏载误差 $u(m_4)$	0.15	0.075	$\sqrt{3}$	4.33×10^{-5}

其合成标准不确定度为:

$$u(m_{\text{天平}}) = \sqrt{(2.89 \times 10^{-5})^2 + 2 \times (4.33 \times 10^{-5})^2 + (2.89 \times 10^{-6})^2} = 6.78 \times 10^{-5} \text{ g}.$$

采用减量法分两步称取标准品,以吗啡为例,2次称取数值分别为42.43,31.80 mg,以均匀分布计算,则吗啡的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m_{\text{吗啡}}) = [(6.78 \times 10^{-5}) / (42.43 \times 10^{-3})]^2 + [(6.78 \times 10^{-5}) / (31.80 \times 10^{-3})]^2 = 2.66 \times 10^{-3}.$$

标准物质称量引入的相对不确定度计算结果见表3,可待因为液标无称量过程,故无标准物质称量引入的相对不确定度。

m ——样品质量, g ;

r ——回收率, $\%$ 。

2.2 来源分析

由2.1中模型可知,测定不确定度主要来自以下几个方面:①标准系列溶液配制过程所引入的不确定度,主要为标准物质称量 $u_{\text{rel}}(m_{\text{标}})$ 及量具使用 $u_{\text{rel}}(V_{\text{标}})$ 引入的不确定度;②绘制标准工作曲线引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{标曲}})$;③样品前处理过程引入的不确定度,主要为样品称量 $u_{\text{rel}}(m_{\text{样}})$ 及样品提取 $u_{\text{rel}}(V_{\text{样}})$ 引入的不确定度;④样品的重复性引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(f)$;⑤由液质联用仪使用引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(f_{\text{液质}})$;⑥回收率引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(r)$ 。其中各不确定度分量相互独立,被测样品的相对标准不确定度合成公式为:

表3 标准物质称量引入的相对不确定度计算结果

Table 3 Standard uncertainty of material weighing

不确定度分量	2次称量结果/ mg		相对不确定度
$u_{\text{rel}}(m_{\text{吗啡}})$	42.43	31.80	2.66×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(m_{\text{那可丁}})$	41.93	30.56	2.75×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(m_{\text{蒂巴因}})$	42.44	32.11	2.65×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(m_{\text{罂粟碱}})$	42.87	31.01	2.70×10^{-3}

(2) 量具使用引入的不确定度:量具的使用及温度是影响其不确定度分量的主要因素,由3部分组成:容量允差 $u(V_1)$ 、估读误差 $u(V_2)$ 及使用与配制时的温度 $u(V_3)$ 影响。

实验室温度为 $20\text{ }^\circ\text{C}$ (在 $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ 之间变动),按照均匀分布,查得 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 的膨胀系数(α),甲醇为 1.2×10^{-3} ,甲酸为 1.03×10^{-3} ,乙腈为 1.37×10^{-3} ,玻璃为 2.5×10^{-4} 。由于含 0.5% 甲酸的甲醇溶液中甲酸含量较小,可忽略不计。玻璃量具的体膨胀系数明显小于液体的膨胀系数,可忽略不计。根据 JJG196—2006《常用玻璃量器检定规程》规定内容,所用量具均为 A 级,欧洲分析化学中心(EURACHEM)认为其服从三角分布,计算各分量的标准不确定度,以 A 类 1 mL 单标线吸量管为例进行计算:

$$u(V_1) = 0.007 / \sqrt{6} = 2.86 \times 10^{-3} \text{ mL};$$

$$u(V_2) = 0.005 \times 1 / \sqrt{6} = 2.04 \times 10^{-3} \text{ mL};$$

$$u(V_{\text{甲醇}}) = 1.2 \times 10^{-3} \times 1 \times 5 / \sqrt{6} = 2.45 \times 10^{-3} \text{ mL};$$

$$u(V_{\text{乙腈}}) = 1.37 \times 10^{-3} \times 1 \times 5 / \sqrt{6} = 2.80 \times 10^{-3} \text{ mL}.$$

吗啡、可待因配置过程中 1 mL 单标线吸量管使用次数为4次(一根吸量管多次使用),其相对标准不确定度分别为:

$$\sqrt{\{(2.86 \times 10^{-3})^2 + (2.04 \times 10^{-3})^2 + (2.45 \times 10^{-3})^2\} + 3\{(2.86 \times 10^{-3})^2 + (2.04 \times 10^{-3})^2 + (2.80 \times 10^{-3})^2\}} \times (1/1^2) = 8.88 \times 10^{-3}$$

罂粟碱、蒂巴因、那可丁使用次数为 5 次,其相对标准不确定度分别为:

$$\sqrt{\{(2.86 \times 10^{-3})^2 + (2.04 \times 10^{-3})^2 + (2.45 \times 10^{-3})^2\} + 4\{(2.86 \times 10^{-3})^2 + (2.04 \times 10^{-3})^2 + (2.80 \times 10^{-3})^2\}} \times (1/1^2) = 9.96 \times 10^{-3}$$

根据表 4 中不同量具的相对标准不确定度及 1.3.1 中标准溶液配制过程,计算配置标准系列溶液引入的相对合成标准不确定度见表 5。

2.3.2 拟合标准工作曲线产生的不确定度 对标曲 7 个不同浓度的点分别测定 1 次,得到相应的色谱峰面积 A,拟合线性回归方程为 $A = aC + b$ (a, b 分别为斜率和截距),测定数据及计算结果如表 6 所示。吗啡、可待因采用内标法,吗啡-D3 浓度为 76.68 ng/mL,峰面积为

2 283,2 308,1 949,2 288,2 186,2 048,2 286;可待因-D3 浓度为 79.92 ng/mL,峰面积为 1 416,1 538,1 329,1 519,1 501,1 453,1 445。取一阳性样品进行 6 次重复测量,样品中 5 种生物碱的平均浓度分别为罂粟碱 4.331 1 ng/mL、那可丁 3.899 1 ng/mL、蒂巴因 3.023 3 ng/mL、吗啡 26.022 1 ng/mL、可待因 23.020 1 ng/mL,由最小二乘法拟合校准曲线引入的标准不确定度如式(3)所示。

表 4 量具使用引入的不确定度[†]

Table 4 Standard uncertainty of measuring tool usage

类别(均为 A 类)	使用次数	允差/mL	$u(V_1)$ /mL	$u(V_2)$ /mL	$u(V_3)$ /mL	k 值	相对标准不确定度
1 mL 单标线吸量管	4(a/c)	±0.007	2.86×10^{-3}	2.04×10^{-3}	2.45×10^{-3} (甲醇)	$\sqrt{6}$	8.88×10^{-3} (a/c)
	5(b)				2.80×10^{-3} (乙腈)		9.96×10^{-3} (b)
2 mL 单标线吸量管	1	±0.010	4.08×10^{-3}	4.08×10^{-3}	5.59×10^{-3} (乙腈)	$\sqrt{6}$	4.02×10^{-3}
5 mL 单标线移液管	2(a/c)	±0.015	2.50×10^{-3}	1.02×10^{-2}	1.22×10^{-2} (甲醇)	$\sqrt{6}$	4.76×10^{-3} (a/c)
	1(b)				1.40×10^{-2} (乙腈)		3.50×10^{-3} (b)
1 mL 流出式分度吸量管	4	±0.008	3.27×10^{-3}	2.04×10^{-3}	2.80×10^{-3} (乙腈)	$\sqrt{6}$	9.53×10^{-3}
10 mL 单标线容量瓶	10(a/b)	±0.020	8.16×10^{-3}	2.04×10^{-2}	2.80×10^{-2} (乙腈)	$\sqrt{6}$	1.13×10^{-2} (a/b)
	9(c)						1.07×10^{-2} (c)
25 mL 单标线容量瓶	1	±0.03	1.22×10^{-2}	5.10×10^{-2}	6.99×10^{-2} (乙腈)	$\sqrt{6}$	3.50×10^{-3}
100 mL 单标线容量瓶	1	±0.10	2.86×10^{-3}	2.04×10^{-1}	2.80×10^{-1} (乙腈)	$\sqrt{6}$	4.47×10^{-3}

† a 为吗啡;b 为罂粟碱、蒂巴因、那可丁;c 为可待因。

表 5 配置标准系列溶液引入的相对合成标准不确定度

Table 5 Standard uncertainty of standard series solution configured

不确定度分量	相对不确定度
$u_{rel}(m_{\text{吗啡}})$	1.92×10^{-2}
$u_{rel}(m_{\text{那可丁}}), u_{rel}(m_{\text{蒂巴因}}), u_{rel}(m_{\text{罂粟碱}})$	1.95×10^{-2}
$u_{rel}(m_{\text{可待因}})$	1.88×10^{-2}

$$u(C) = \frac{1}{a}$$

$$\sqrt{\left\{ \frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (aC_i + b)]^2}{n-2} \right\} \left[\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x} - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2} \right]}, \quad (3)$$

式中:

a ——曲线的斜率;

$$u_{rel}(m_{\text{样}}) = \sqrt{[(2.89 \times 10^{-5})^2 + 3 \times (2.89 \times 10^{-4})^2] \times (1/2.027^2 + 1/2.003^2)} = 3.52 \times 10^{-4}$$

b ——曲线的截距;

x ——样品的平均浓度,ng/mL;

C ——标准工作溶液浓度的平均值,ng/mL;

n ——标曲的测定次数, $n=7$;

P ——样品的测定次数, $P=6$;

i ——不同浓度标准工作溶液的下角标。

拟合标准工作曲线进行样品测量所产生的相对标准不确定度见表 7。

2.3.3 样品前处理及测量引入的不确定度

(1) 样品称量引入的不确定度:采用万分之一天平,其影响因素及计算与“2.3.1(1)”中有关过程相同。根据检定证书,各分量的标准不确定度如表 8 所示。

平行称取 2 份样品,称样量分别为 2.027 2,2.003 8 g,则样品称量引入的相对不确定度为:

表6 标准曲线相关数据
Table 6 Standard curve data

组分	回归方程	相关系数 R^2	$s(C)$	$u(C)$
罂粟碱	$A=966.104 2C+183.577 6$	0.999 1	2.62×10^2	1.53×10^{-5}
那可丁	$A=2 159.589 7C+232.764$	0.999 6	3.90×10^2	1.02×10^{-5}
蒂巴因	$A=782.967 7C-0.594 4$	0.999 8	8.93×10^1	6.50×10^{-2}
吗啡	$A=0.615 5C-0.007 9$	0.999 6	6.31×10^{-3}	5.71×10^{-3}
可待因	$A=1.561 6C-0.003 7$	0.999 4	1.81×10^{-2}	6.46×10^{-3}

表7 配置标准系列溶液引入的相对合成标准不确定度

Table 7 Standard uncertainty of standard series solution configured

不确定度分量	相对不确定度
$u_{rel}(m_{\text{吗啡}})$	2.19×10^{-4}
$u_{rel}(m_{\text{蒂巴因}})$	2.15×10^{-2}
$u_{rel}(m_{\text{罂粟碱}})$	3.51×10^{-2}
$u_{rel}(m_{\text{那可丁}})$	2.61×10^{-2}
$u_{rel}(m_{\text{可待因}})$	2.81×10^{-4}

表8 天平($d=0.1$ mg)称量引入的不确定度

Table 8 Standard uncertainty for balance ($d=0.1$ mg) measurement

不确定度分量	允差/mg	区间半宽/mg	k 值	标准不确定度/g
示值误差 $u(m_1)$	± 0.5	0.5	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-4}
分辨力 $u(m_2)$	0.1	0.05	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-5}
重复性 $u(m_3)$	1.0	0.5	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-4}
偏载误差 $u(m_4)$	1.0	0.5	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-4}

(2) 样品提取过程引入的不确定度:影响样品提取过程引入的不确定度的主要因素为量具的使用,与“2.3.1 (2)”中相关过程相同。根据 JJG 196—2006 规定内容,对所用 A 级量具各分量的标准不确定度进行评定, A 类 15 mL 单标线吸量管的容量允差为 $u(V_1) = 0.025/\sqrt{6} = 1.02 \times 10^{-2}$ mL, 估读误差为 $u(V_2) = (0.005 \times 15)/\sqrt{6} = 3.06 \times 10^{-2}$ mL, 实验室温度为 $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$, 其标准不确定度为 $u(V_{\text{温}}) = (1.37 \times 10^{-3} \times 15 \times 5)/\sqrt{6} = 4.20 \times 10^{-2}$ mL。

表9 样品数据

Table 9 Analytical results of sample

组分	浓度/(ng · mL ⁻¹)						平均浓度/(ng · mL ⁻¹)	标准偏差
	1	2	3	4	5	6		
罂粟碱	4.359 7	4.237 4	4.406 6	4.395 6	4.312 3	4.329 6	4.340 2	6.22×10^{-2}
那可丁	3.942 1	3.885 7	3.817 8	3.954 1	4.023 6	3.814 0	3.906 2	8.26×10^{-2}
蒂巴因	3.022 3	3.082 8	3.034 8	2.894 4	3.035 6	3.071 4	3.023 6	6.75×10^{-2}
吗啡	25.263 3	26.430 0	27.861 6	23.361 7	24.918 1	28.304 7	26.023 2	1.88
可待因	25.086 1	23.752 8	22.418 3	24.279 3	20.103 5	22.454 1	23.015 7	1.77

使用量具定容过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_{\text{样}}) =$$

$$\sqrt{(1.02 \times 10^{-2})^2 + (3.06 \times 10^{-2})^2 + (4.20 \times 10^{-2})^2} / 2.003 8 = 2.64 \times 10^{-2}。$$

2.3.4 样品重复性引入的不确定度 样品重复性引入的不确定度包含了 c 、 V 和 m 测量时的重复性不确定度的分量,属 A 类评定。对样品进行 6 次测定的值及其平均值及应用贝塞尔公式计算单次测量结果的试验标准偏差 ($n=6$) 结果见表 9。

样品重复性引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(f_{\text{罂粟碱}}) = 6.22 \times 10^{-2} / 4.340 2 = 1.43 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(f_{\text{那可丁}}) = 8.26 \times 10^{-2} / 3.906 2 = 2.11 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(f_{\text{蒂巴因}}) = 6.75 \times 10^{-2} / 3.023 6 = 2.23 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(f_{\text{吗啡}}) = 1.88 / 26.023 2 = 7.22 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(f_{\text{可待因}}) = 1.77 / 23.015 7 = 7.69 \times 10^{-2}。$$

2.3.5 由液质联用仪使用引入的不确定度 由校准证书上可知, Agilent 1200-6410 液质联用仪的峰面积重复性为 0.7%, 则其相对扩展不确定度为 0.7%, 按均匀分布计算, 其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(f_{\text{液质}}) = 0.7\% / \sqrt{3} = 4.04 \times 10^{-3}。$$

2.3.6 样品回收率引入的不确定度 对上述样品进行 6 次加标回收试验, 将混合标准品溶液加入空白样品中, 照 1.3.2 方法处理, 即得加标回收样品, 并对加标样品进行测定, 样品添加水平及所得回收率如表 10 所示。

用贝塞尔公式计算回收率的标准偏差, 样品回收率引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(r_{\text{罂粟碱}}) = \frac{1.05 \times 10^{-2}}{80.8\% \times \sqrt{6}} = 5.31 \times 10^{-3};$$

表 10 样品回收率

Table 10 The recovery rate of sample (n=6)

组分	添加水平/ (mg · kg ⁻¹)	回收率 r/%						平均回收 率 r/%	标准偏差
		1	2	3	4	5	6		
罂粟碱	0.118	79.1	82.2	81.3	81.0	80.2	80.9	80.8	1.05 × 10 ⁻²
那可丁	0.114	77.7	81.7	83.9	79.2	82.7	77.4	80.4	2.72 × 10 ⁻²
蒂巴因	0.103	64.8	63.9	64.1	65.0	64.7	65.4	64.7	5.61 × 10 ⁻³
吗啡	0.530	107.8	124.9	113.1	112.0	109.0	106.5	112.2	6.70 × 10 ⁻²
可待因	0.499	113.5	120.0	108.4	110.6	111.2	114.4	113.0	4.03 × 10 ⁻²

$$u_{rel}(r_{\text{那可丁}}) = \frac{2.72 \times 10^{-2}}{80.4\% \times \sqrt{6}} = 1.38 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(r_{\text{蒂巴因}}) = \frac{5.61 \times 10^{-2}}{64.7\% \times \sqrt{6}} = 3.54 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(r_{\text{吗啡}}) = \frac{6.70 \times 10^{-2}}{112.2\% \times \sqrt{6}} = 2.44 \times 10^{-2};$$

$$u_{rel}(r_{\text{可待因}}) = \frac{4.03 \times 10^{-2}}{113.0\% \times \sqrt{6}} = 1.46 \times 10^{-2}.$$

采用 t 检验对平均回收率进行显著性检验。

$$t_{\text{罂粟碱}} = \frac{|100\% - \bar{r}_{\text{罂粟碱}}|}{u_{rel}(r_{\text{罂粟碱}})} = \frac{|100\% - 80.8\%|}{5.31 \times 10^{-3}} = 36.2;$$

$$t_{\text{那可丁}} = \frac{|100\% - \bar{r}_{\text{那可丁}}|}{u_{rel}(r_{\text{那可丁}})} = \frac{|100\% - 80.4\%|}{1.38 \times 10^{-2}} = 14.2;$$

$$t_{\text{蒂巴因}} = \frac{|100\% - \bar{r}_{\text{蒂巴因}}|}{u_{rel}(r_{\text{蒂巴因}})} = \frac{|100\% - 64.7\%|}{3.54 \times 10^{-2}} = 9.97;$$

$$t_{\text{吗啡}} = \frac{|100\% - \bar{r}_{\text{吗啡}}|}{u_{rel}(r_{\text{吗啡}})} = \frac{|100\% - 112.2\%|}{2.44 \times 10^{-2}} = 5.00;$$

$$t_{\text{可待因}} = \frac{|100\% - \bar{r}_{\text{可待因}}|}{u_{rel}(r_{\text{可待因}})} = \frac{|100\% - 113\%|}{1.46 \times 10^{-2}} = 8.90.$$

5 种成分的 t 值与 95% 置信度, n-1 自由度的双边临界值比较, 结果均大于 2.571, 说明 r 与 100% 有非常显著差异, 必须在计算公式中采用回收率校正因子 r 修正结果。

2.3.7 罂粟壳中 5 种生物碱的合成标准不确定度及扩展不确定度 各不确定分量相互独立, 按式(2)计算可得相对合成标准不确定度如表 11 所示。

由模型和 2 次独立样品的试验结果, 计算得到 2 份火锅食品中 5 种物质的含量分别为罂粟碱 31.1 μg/kg、吗啡 179.0 μg/kg、那可丁 28.5 μg/kg、蒂巴因 22.2 μg/kg、可待因 171.0 μg/kg, 合成标准不确定度为:

$$U(X_{\text{罂粟碱}}) = U_{rel}(X_{\text{罂粟碱}}) \times \bar{X}_{\text{罂粟碱}} = (5.1 \times 10^{-2}) / \sqrt{2} \times 31.1 = 1.2 \mu\text{g/kg};$$

表 11 5 种生物碱的相对合成标准不确定度

Table 11 Standard uncertainty of 5 alkaloids

不确定度分量	相对不确定度
$U_{rel}(X_{\text{罂粟碱}})$	5.1×10^{-2}
$U_{rel}(X_{\text{吗啡}})$	8.4×10^{-2}
$U_{rel}(X_{\text{那可丁}})$	5.0×10^{-2}
$U_{rel}(X_{\text{蒂巴因}})$	5.8×10^{-2}
$U_{rel}(X_{\text{可待因}})$	8.5×10^{-2}

$$U(X_{\text{吗啡}}) = U_{rel}(X_{\text{吗啡}}) \times \bar{X}_{\text{吗啡}} = (8.4 \times 10^{-2}) / \sqrt{2} \times 179 = 11 \mu\text{g/kg};$$

$$U(X_{\text{那可丁}}) = U_{rel}(X_{\text{那可丁}}) \times \bar{X}_{\text{那可丁}} = (5.0 \times 10^{-2}) / \sqrt{2} \times 28.5 = 1.0 \mu\text{g/kg};$$

$$U(X_{\text{蒂巴因}}) = U_{rel}(X_{\text{蒂巴因}}) \times \bar{X}_{\text{蒂巴因}} = (5.8 \times 10^{-2}) / \sqrt{2} \times 22.2 = 0.91 \mu\text{g/kg};$$

$$U(X_{\text{可待因}}) = U_{rel}(X_{\text{可待因}}) \times \bar{X}_{\text{可待因}} = (8.5 \times 10^{-2}) / \sqrt{2} \times 171 = 11 \mu\text{g/kg}.$$

取包含因子 k=2, 包含概率 95%, 计算扩展不确定度可得:

$$U_{\text{罂粟碱}} = k \times U_{\text{罂粟碱}}(X) = 2 \times 1.2 = 2.4 \mu\text{g/kg}.$$

同法可得:

$$U_{\text{吗啡}} = 22 \mu\text{g/kg}, U_{\text{那可丁}} = 2.0 \mu\text{g/kg}, U_{\text{蒂巴因}} = 1.9 \mu\text{g/kg}, U_{\text{可待因}} = 22 \mu\text{g/kg}.$$

因此, 液质联用法测定火锅食品中 5 种生物碱测量结果可表示为: 罂粟碱 (31.1 ± 2.4) μg/kg, k=2; 吗啡 (179 ± 22) μg/kg, k=2; 那可丁 (28.5 ± 2.0) μg/kg, k=2; 蒂巴因 (22.2 ± 1.9) μg/kg, k=2; 可待因 (171 ± 22) μg/kg, k=2。

3 结论

试验评定了液质联用法测定火锅食品中 5 种罂粟壳生物碱含量的不确定度, 根据各分量不确定度的计算结果可以得出, 影响检测结果不确定度的主要因素有样品回收率, 样品平行试验重复性, 样品提取, 校准曲线拟合, 标准工作溶液的配制。从校准曲线拟合这一不确定

(下转第 154 页)

- [2] 王安建, 高帅平, 田广瑞, 等. 花生热泵干燥特性及动力学模型[J]. 农产品加工, 2015(9): 57-60.
- [3] 陈霖. 基于控温的花生微波干燥工艺[J]. 农业工程学报, 2011, 27(S2): 267-271.
- [4] 杨屹立, 杨玲, 徐武明, 等. 多孔介质物料热风干燥研究进展[J]. 农机化研究, 2011, 33(3): 242-246.
- [5] SEERANGURAYAR T, ABDULRAHIM M, AL-ISMAILI L H, et al. Experimental investigation of shrinkage and microstructural properties of date fruits at three solar drying methods[J]. Solar Energy, 2019, 180: 445-455.
- [6] 白竣文, 田潇瑜, 刘宇婧, 等. 大野芋薄片干燥特性及收缩动力学模型研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(4): 124-131.
- [7] APRAJEETA J, GOPIRAJAH R, ANANDHARMAKRISHNAN C. Shrinkage and porosity effects on heat and mass transfer during potato drying[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 144: 119-128.
- [8] 李建欢, 杨薇. 澳洲坚果热风干燥过程中果壳收缩特性[J]. 农业工程学报, 2012, 28(11): 268-273.
- [9] SAGAR V R, SURESH K P. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: A review[J]. Journal of Food Science and Technology, 2010, 47(1): 15-26.
- [10] 陈良元, 韩李锋, 李旭, 等. 茄子片热风干燥收缩特性及其修正的湿分扩散动力学模型[J]. 农业工程学报, 2016, 32(15): 275-281.
- [11] 谭礼斌. 果蔬多孔介质干燥热质传递及应力应变研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2017: 1-2.
- [12] DUAN Xu, LIU Wei, REN Guang-yue, et al. Comparative study on the effects and efficiencies of three sublimation drying methods for mushrooms[J]. Int J Agric & Biol Eng, 2015, 8(1): 91-97.
- [13] CURCIO S, AVERSA M. Influence of shrinkage on convective drying of fresh vegetables: A theoretical model[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 123(123): 36-49.
- [14] 娄正, 刘清, 师建芳, 等. 红枣气体射流冲击干燥收缩特性研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(S1): 241-246.
- [15] YADOLLAHINIA A, JAHANGIRI M. Shrinkage of potato slice during drying[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 94(1): 52-58.
- [16] 许冰洋, 朱文魁, 潘广乐, 等. 基于收缩特性分析的叶丝快速对流干燥动力学模型[J]. 烟草科技, 2015, 48(9): 69-74.
- [17] 韦玉龙, 于宁, 陈恺, 等. 热风干制对红枣收缩特性的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(22): 114-118, 123.
- [18] 王凤贺, 丁治春, 陈鹏泉, 等. 油茶籽热风干燥动力学研究[J]. 农业机械学报, 2018, 49(S1): 426-432.
- [19] 王宝霞. 花生壳纤维素纳米纤维及其复合材料的制备与性能研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2017: 1-2.
- [20] 李宇健, 陈复生, 郝莉花, 等. 粉碎处理对水酶法提取花生营养成分及其组成影响规律研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(12): 1-5.

(上接第 82 页)

度量分量可以看出,采用内标法进行测定的吗啡和可待因相对标准不确定度明显小于其他 3 种物质。在试验中,建议通过以下几个方面来降低检测结果的不确定度:①减少量具使用次数并规范估读量具读数至最小分度值的 1/5~1/10,可以降低量具引入的测量不确定度;②对需检测成分加入内标定量,可以降低不同样品基质所引入的不确定度;③被测样品浓度均值应接近所配制的罂粟碱等 5 种物质工作曲线的中间位置,以降低标准曲线变动引入的测量不确定度;④提高人员操作熟练程度,可以适当降低样品重复性所引入的不确定度;⑤试验前提前稳定仪器状态并定期对所涉仪器进行检定,使仪器保持较高的灵敏度及稳定性,可以降低仪器引入的不确定度。

参考文献

- [1] 程月红, 鲍连艳, 于艳艳, 等. 食品中罂粟壳管理现状及检测方法研究概况[J]. 中国调味品, 2018, 43(11): 196-200.
- [2] 张林田, 史佳虹, 杨晞, 等. 火锅底料及小吃类食品中非法添加罂粟壳的危害及检测技术研究进展[J]. 福建分析测试, 2014, 23(3): 9-13.
- [3] 王学琴, 李承荣, 滕岩, 等. 电子天平示值误差测量结果的不确定度评定[J]. 化学分析计量, 2012, 21(4): 58-59.
- [4] 戴文斌. A 级容量瓶定容的不确定度评定[J]. 计量与测试技术, 2014(10): 53-54.
- [5] 岳娜. 常用玻璃量器容量测量结果的不确定度评定[J]. 计量与测试技术, 2012, 39(7): 66-68.
- [6] 黎施展, 陆燕, 彭荣锋, 等. 火焰原子吸收光谱法测定水样中铜含量的不确定度评定[J]. 广西农学报, 2009, 24(1): 40-42, 67.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 27411—2012 检测实验室中常用不确定度评定方法与表示[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 11.
- [8] 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: 中国标准出版社, 2012: 5-27.
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS—GL06—2019 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019: 7-88.