

气相色谱-质谱法测定奶粉中香兰素的不确定度评估

董淑芬¹, 舒平², 徐幸^{2*}

(1. 云南省产品质量监督检验研究院, 昆明 650223; 2. 大理州质量技术监督综合检测中心, 大理 671000)

摘要: **目的** 采用气相色谱-质谱法对奶粉中香兰素含量的不确定度评估。**方法** 建立不确定度评估的数学模型, 通过对不确定度的各主要分量进行分析计算, 得出合成不确定度以及扩展不确定度。**结果** 当香兰素的测定结果为 57.1 mg/kg 时, 其扩展不确定度为 4.4 mg/kg, $k=2$ 。**结论** 采用气相色谱-质谱法测定奶粉中香兰素含量, 其不确定度的主要来源为样品的回收率和最小二乘法拟合的标准曲线, 该评估模型为检测奶粉中香兰素的不确定度评估提供了参考依据。

关键词: 气相色谱-质谱法; 不确定度; 奶粉; 香兰素

Evaluation of uncertainty in determination of vanillin in milk powder by gas chromatography-mass spectrometry

DONG Shu-Fen¹, SHU Ping², XU Xing^{2*}

(1. Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming 650223, China;
2. Dali Comprehensive Inspection Centre of Quality and Technical Supervision, Dali 671000, China)

ABSTRACT: Objective To develop an uncertainty evaluation method of vanillin in milk powder by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** The mathematical model of uncertainty evaluation was established after the sources of uncertainty were systematically analyzed. Through calculating the each uncertainty during analysis process, the combined and expanded uncertainties were obtained. **Results** When the measurement result of vanillin was 57.1 mg/kg, the expanded uncertainty was 4.4 mg/kg, $k=2$. **Conclusion** The main sources of uncertainty were caused by the recovery for samples and the establishment of standard curve with the least squares. It provides a reference basis for uncertainty evaluation of vanillin in milk powder.

KEY WORDS: gas chromatography-mass spectrometry; uncertainty; milk powder; vanillin

1 引言

香兰素化学名称为 3-甲氧基-4-羟基苯甲醛(vanillin), 分子式为 $C_8H_8O_3$, CAS 号为 121-33-5, 存在于各种水果中^[1], 也可人工合成, 是一种食品香味添加剂, 运用于各种

食品中调香, 如饮料、乳制品、糕点等。而香兰素的安全性仍存在一定争议, 欧盟专家委员会研究发现, 大量使用香兰素对人体有危害, 可导致头痛、呕吐, 甚至损伤肝肾等^[2]。国家标准 GB2760《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定了香兰素在食品中的使用限量^[3], 但目前仅

基金项目: 云南省卫生厅制修订食品安全地方标准项目(云卫[2014]DB003)

Fund: Support by the Health Department of Yunnan Province on Formulation of Food Safety Standards (YH [2014] DB003)

*通讯作者: 徐幸, 工程师, 主要研究方向为食品安全质量检测。E-mail: xuxing1983@163.com

*Corresponding author: XU Xing, Engineer, Dali Quality and Technical Supervision Comprehensive Inspection Centre, No. 1 Mailbox, Economic Development Zone, Dali 671000, China. E-mail: xuxing1983@163.com

有使用限量的标准,没有标准的检测方法。而文献报道中,对食品中香兰素的检测方法有气相色谱^[4]、液相色谱^[5]、气质联用^[6]、液质联用^[7]或毛细管电泳^[8]等方法,由于这些不是标准规定的检测方法,为保证检测数据的准确,规范测量结果的表达,对香兰素进行测量不确定度的评估具有重要意义。因此,根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[9]和 CNAS-GL06《化学分析中不确定度的评估指南》^[10]规定的基本方法和程序,对已建立的测定奶粉中香兰素的方法,进行不确定度评估,分析影响结果的各种因素,在检测过程中加以控制,以达到提高检测质量的目的。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

奶粉(市售);香兰素标准品(纯度≥99%,美国 Sigma 公司);无水乙醇(色谱纯,德国 Merck 公司);乙醚(分析纯,利安隆博华医药化学有限公司);0.22 μm 有机相滤膜;其他试剂均为分析纯。

2.2 仪器与设备

GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);Maxi Mix II 涡旋混匀器(美国 Thermo 公司);AL204 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);超纯水机(Millipore 公司);台式高速离心机(湖南湘仪公司)。

2.3 方法

2.3.1 标准溶液的配制

称取香兰素标准品 100 mg(精确值 0.1 mg),用无水乙醇溶解并定容至 100 mL,配制成 1 mg/mL 的标准物质储备溶液,将标准储备液逐级稀释,得到质量浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L 的香兰素标准工作液,供气相色谱-质谱联用仪测定。

2.3.2 样品前处理

称取 1 g(精确至 0.01 g)奶粉试样于 50 mL 具塞离心管中,加入 5 mL 超纯水溶解,加入 3 g NaCl,再加入 25 mL 乙醚振荡提取 5 min,以 6000 r/min 离心 5 min,取上清液,过无水硫酸钠收集滤液,再向离心管中加入 25 mL 乙醚重复提取 1 次,合并 2 次滤液,于旋转蒸发器上挥至近干,残留物用 5 mL 乙醇定容,用 0.22 μm 有机相滤膜过滤,供气相色谱-质谱联用仪测定。

2.3.3 气相色谱-质谱仪的分析条件

色谱柱:DB-1701 柱(30 mm×0.25 mm,0.25 μm);载气:氦气(≥99.999%),流速 1.5 mL/min,进样口温度 250 °C,进样量 1 μL;不分流进样。

升温程序:70 °C 保持 1 min,以 10 °C/min 升至 240 °C,保持 1 min^[6]。电子轰击(EI)离子源;电子能量 70 eV;离子源温度 230 °C;接口温度 280 °C;溶剂延迟时间 5 min;选

择离子扫描(SIM)模式,定量离子为 151,参考离子为 81、123、152。

2.4 数学模型的建立与不确定度来源的分析

2.4.1 数学模型

建立测量值的数学模型进行不确定度的评估,进而分析其可能的不确定来源。本实验中,香兰素的数学计算模型如下:

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times f_{rec} \times 1000} \quad (1)$$

式中: X —试样中香兰素的含量(mg/kg); C —从标准曲线上测得试液中香兰素的质量浓度(mg/L); V —试液定容体积(mL); m —试样质量(g); f_{rec} —样品加标回收率(%)。

2.4.2 不确定度分量的主要来源

根据上述建立的方法分析奶粉样品时,其测量不确定度的主要来源可分为以下几个方面^[11]: (1)标准溶液的不确定度,由标准品纯度、标准溶液的配制引入的不确定度,以及校准曲线的线性拟合产生的不确定度。(2)样品前处理过程的不确定度,样品的称量、定容体积及加标回收率引入的不确定度。

3 结果与分析

3.1 标准溶液引入的不确定度

3.1.1 标准品纯度引入的不确定度

由证书可知香兰素的纯度≥99%,取矩形分布,由标准品纯度引入的不确定度为:

$$u_{rel}(p) = \frac{1-0.99}{\sqrt{3}} = 0.00577 \quad (2)$$

3.1.2 标准品称量过程引入的不确定度

天平允许的最大误差为±0.1 mg,称取香兰素标准品 100 mg,取矩形分布,相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(m) = \frac{0.1}{\sqrt{3} \times 100} = 0.00058 \quad (3)$$

3.1.3 标准溶液稀释过程中玻璃量器和移液器引入的不确定度

标准溶液稀释过程中使用了玻璃量器和移液器,按 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[11]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[12]要求,对使用的玻璃量器和移液器均有相应的最大允许误差,取矩形分布,标准溶液稀释过程中玻璃量器和移液器引入的相对标准不确定度见表 1。

在标准溶液稀释过程中,使用 100 mL 容量瓶 6 次,1000 μL 移液器移取 1000 μL 体积 3 次,1000 μL 移液器移取 500 μL 体积 1 次,200 μL 移液器移取 200 μL 体积 1 次,100 μL 移液器移取 100 μL 体积 1 次,由表 1 中的数据合成标准溶液稀释过程中,玻璃量器与移液器引入的相对不确定度:

$$u_{rel}(V) = \sqrt{6u_{v1rel}^2 + 3u_{v2rel}^2 + u_{v3rel}^2 + u_{v4rel}^2 + u_{v5rel}^2} = 0.01854 \quad (4)$$

3.1.4 最小二乘法拟合标准曲线的不确定度

对标准溶液进行测定, 得到标准曲线拟合的不确定度, 标准曲线的质量浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L, 每个浓度测量 2 次。用最小二乘法拟合标准溶液浓度与峰面积^[13], 标准曲线的数据见表 2。

使用此标准曲线进行测量时, 对被测样品溶液测量 2 次, 由回归方程计算得样品中的香兰素的最佳估计值为 12.8 mg/L。由最小二乘法拟合标准曲线引入的不确定度公式^[9]为:

$$u_{rel}(c) = \frac{S(A)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{cc}}} \quad (5)$$

其中:

$$S(A) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (Y_{ij} - Y_i)^2}{mn - 2}} \quad (6)$$

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m C_{ij}}{mn} \quad (7)$$

$$S_{cc} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (C_{ij} - \bar{C})^2 \quad (8)$$

式中: $S(A)$ 为曲线的标准偏差; $\bar{C}$ 为标准溶液各质量浓度点 C_{ij} 的平均值; S_{cc} 为标准溶液各质量浓度点 C_{ij} 与 $\bar{C}$ 之差的平方和; b 为标准曲线斜率; p 为样品平行测定次数; m 为标准溶液重复测定的次数; n 为标准溶液质量浓度的个数; C_0 为待测样品溶液的平均质量浓度; Y_{ij} 为各质量浓度点测定的峰面积; Y_i 为线性方程计算得到的各浓度点的峰面积^[14]。

由表 2 数据和上述公式计算出 $S(A)=8707.93$; $\bar{C}=7.6$; $S_{cc}=482.4$; $u_{rel}(c)=0.2859$

由标准曲线拟合的相对不确定度为:

$$u_{rel}(c') = \frac{u_{rel}(c)}{C_0} = \frac{0.2859}{12.8} = 0.02233 \quad (9)$$

因此, 样品在测定过程中, 由标准溶液和校准曲线各分量合成的不确定度为:

$$u_{rel}(C) = \sqrt{u_{rel}(p)^2 + u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(V)^2 + u_{rel}(c')^2} = 0.02960 \quad (10)$$

3.2 样品前处理过程引入的不确定度

3.2.1 样品称量过程引入的不确定度

天平校准的允许最大误差为 ± 0.01 g, 称取奶粉样品 1.0 g, 取矩形分布, 相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(W) = \frac{0.01}{\sqrt{3} \times 1} = 0.00577 \quad (11)$$

3.2.2 样品定容过程引入的不确定度

样品用 5 mL 移液管定容, 5 mL 单标线 A 级移液管的最大允许误差为 ± 0.015 mL, 由定容引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(v) = \frac{0.015}{\sqrt{3} \times 5} = 0.00173 \quad (12)$$

3.2.3 添加回收率引入的不确定度

对空白样品进行 6 次加标回收试验, 添加水平为 10 mg/L, 回收率分别为 92.5%、98.3%、105.6%、102.4%、94.7% 和 91.4%, 平均回收率为 97.5%, 标准偏差为 0.0566, 由回收率引入的相对不确定度为^[15]:

$$u_{rel}(R) = \frac{0.0566}{\sqrt{6} \times 97.5\%} = 0.02371 \quad (13)$$

表 1 标准溶液配制过程中玻璃量器和移液器引入的不确定度
Table 1 Uncertainty results from the preparation of standard solution by volumetric flasks and pipettes

玻璃量器与移液器	最大允许误差	定容或移取体积	相对标准不确定度
100 mL 单标线容量瓶 A 级	± 0.10 mL	100 mL	$u_{v1rel}=0.00058$
1000 μ L 移液器 1000 μ L 检定点	$\pm 1.0\%$	1000 μ L	$u_{v2rel}=0.00577$
1000 μ L 移液器 500 μ L 检定点	$\pm 1.0\%$	500 μ L	$u_{v3rel}=0.00577$
200 μ L 移液器 200 μ L 检定点	$\pm 1.5\%$	200 μ L	$u_{v4rel}=0.00866$
100 μ L 移液器 100 μ L 检定点	$\pm 2.0\%$	100 μ L	$u_{v5rel}=0.01155$

表 2 香兰素标准曲线的数据($n=2$)
Table 2 Data for standard curve of vanillin ($n=2$)

标准溶液浓度(mg/L)	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0
标准溶液峰面积	33460	60779	145820	275066	509970
	32685	63288	141554	271589	495635

注: 曲线方程为 $Y=24674X+15459$, 其中斜率 $b=24674$, 截距 $a=15459$, 相关系数为 0.9979。

对回收率进行显著性检验:

$$t = \frac{|100\% - 97.5\%|}{0.02371} = 1.061 \quad (14)$$

由 $f=n-1=5$, 查 t 检验临界值表, 本实验中 $t=1.543$, $t < t_{(0.05,5)}$, 小于双侧临界值 $t_{(0.05,5)}=2.571$, 平均回收率与 100% 不具显著性差异, 则回收率 f_{rec} 不必带入公式修正结果^[16]。

在样品前处理过程中, 各分量合成的不确定度为:

$$u_{rel}(S) = \sqrt{u_{rel}(W)^2 + u_{rel}(v)^2 + u_{rel}(R)^2} = 0.02446 \quad (15)$$

3.3 测量不确定度的评定与报告

3.3.1 合成标准不确定度

将奶粉中香兰素含量的相对不确定度各分量来源的数据合成, 得到合成标准不确定度为:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}(C)^2 + u_{rel}(S)^2} = 0.0384 \quad (16)$$

3.3.2 扩展不确定度

根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[9], 在 95% 的置信水平下, 取包含因子 $k=2$, 奶粉样品中香兰素的测量值为 12.8 mg/L, 结合称样量和定容体积, 计算得到样品中香兰素的含量为 57.1 mg/kg, 则扩展不确定度为:

$$U = 57.1 \times 0.0384 \times 2 = 4.4 \text{ mg/kg} \quad (17)$$

按照该方法测定奶粉中香兰素的测定结果报告为: $X = (57.1 \pm 4.4) \text{ mg/kg}$; $k=2$ 。

4 结 论

在测定奶粉中香兰素的过程时, 对检测各环节不确定度进行评估分析, 得出该方法的扩展不确定度为 4.4 mg/kg, 取包含因子 $k=2$ 。测量过程中影响检测结果的不确定度主要来源为最小二乘法拟合的标准曲线和回收率引入的不确定度。在今后的检测过程中, 应加强对以上因素的质量控制, 进一步减小测量数据的不确定度, 以保障检测结果的准确性。

参考文献

- [1] Goodner KL, Jella P, Rouseff RL. Determination of vanillin in orange, grapefruit, tangerine, lemon, and lime juices using GC-olfactometry and GC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(7): 2882-2886.
- [2] Ni YN, Zhang GW, Kokot S. Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks [J]. Food Chem, 2005, 89(3): 465-473.
- [3] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. GB 2760-2014 National food safety standard, Standard for uses of food additives [S].
- [4] Chen S, Xu Y, Qian MC. Aroma characterization of Chinese rice wine by gas chromatography-olfactometry, chemical quantitative analysis, and aroma reconstitution [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(47): 11295-11302.
- [5] Waliszewski KN, Pardio VT, Ovando SL. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract [J]. Food Chem, 2007, 101(3): 1059-1062.
- [6] 彭飞进, 徐幸, 舒平, 等. GC 和 GC-MS 法测定饮料中香兰素和乙基香兰素含量[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 303-306.
Peng FJ, Xu X, Shu P, et al. Determination of vanillin and ethyl vanillin contents in beverages by GC and GC-MS [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(15): 303-306.
- [7] Yan S, Chao H, Bin L, et al. Determination of vanillin, ethyl vanillin, and coumarin in infant formula by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. J Dairy Sci, 2014, 97(2): 679-686.
- [8] Ohashi M, Omae H, Hashida M, et al. Determination of vanillin and related flavor compounds in cocoa drink by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2007, 1138(1-2): 262-267.
- [9] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [10] CNAS-GL06: 2006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL06: 2006 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [11] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [12] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].
- [13] 申中兰, 袁东, 王坤, 等. 固相萃取-气相色谱-稳定性同位素稀释质谱法测定酱油中氯丙醇的不确定度评定[J]. 中国食品学报, 2013, 13(11): 132-138.
Shen ZL, Yuan D, Wang K, et al. Estimation of uncertainty in determination of chloropropanols in soy sauce by gas chromatography-stable isotope dilution mass spectrometry [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2013, 13(11): 132-138.
- [14] 徐幸, 张晓鸣, 舒平, 等. 超高效液相色谱-稳定性同位素稀释质谱法测定米线中乌洛托品的不确定度评估[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 24-28.
Xu X, Zhang XM, Shu P, et al. Evaluation of uncertainty in determination of urotropine in rice noodles by ultra performance liquid chromatography-stable isotope dilution mass spectrometry [J]. Food Sci, 2015, 36(16): 24-28.
- [15] 张燕, 舒平, 狄家卫, 等. Florisil 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱联用法测定水果中氯吡啶的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 4212-4218.
Zhang Y, Shu P, Di JW, et al. Uncertainty evaluation of forchlorfenuron in fruits by florisil dispersive solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 4212-4218.
- [16] Walcorczyk S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty [J]. Talanta, 2014, (120): 106-113.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



董淑芬, 工程师, 主要研究方向为实验室质量控制。
E-mail: 1928262198@qq.com



徐 幸, 工程师, 主要研究方向为食品安全质量检测。
E-mail: xuxing1983@163.com

“农药残留检测技术与风险评估”专题征稿函

农业产业化发展越来越依赖于现代农药的使用。农药使用为农产品生产、产量增长提供保障, 而不合理使用导致农产品中的农药残留超标, 影响消费者食用安全和污染环境。农药残留超标也影响农产品的贸易, 世界各国对各种农副产品中农药残留都做制定了越来越严格的限量标准。

鉴于此, 本刊特别策划了“农药残留检测技术与风险评估”专题, 由中国农业大学潘灿平教授担任专题主编。专题将围绕(1)食品中农药残留检测的前处理技术; (2)食品中农药残留快速检测方法、残留的分布规律与减低措施; (3)残留危害的风险评估、农药田间规范残留试验结果; (4)残留检测的规范化采样和检测不确定度研究; (5)农药残留在环境和作物中的迁移、代谢和转化规律; (6)食品加工过程中农药残留的质与量的变化; (7)国际农药残留标准制定与限量标准的协调一致等多方面展开讨论, 计划在 2016 年 8 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 潘灿平教授和主编吴永宁研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2016 年 7 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部