

豆腐皮中乌洛托品残留量的测定不确定度评估

白 祥¹, 魏用林², 胡赠彬¹, 庞黎明¹, 董淑芬¹, 张学忠¹, 冯 雷¹, 牛之瑞^{1*}

(1. 云南省产品质量监督检验研究院, 国家热带农副产品监督检验中心, 昆明 650223;

2. 云南省计量测试技术研究院, 昆明 650228)

摘 要: **目的** 评定液相色谱-质谱法测定豆腐皮中乌洛托品残留量的不确定度。**方法** 运用 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》分析豆腐皮中的乌洛托品残留量测量过程中的不确定度来源, 通过建立数学模型量化不确定度分量, 计算合成不确定度和扩展不确定度。**结果** 本方法的不确定度主要来源于液相色谱质谱仪设备。当豆腐皮中乌洛托品残留量为 0.523 mg/kg, 扩展不确定度为 0.018 mg/kg, 乌洛托品残留量表示为 (0.523 ± 0.018) mg/kg ($k=2$)。**结论** 该评定方法可为液相色谱-质谱法测定豆腐皮中乌洛托品残留量的结果和方法的可靠性提供科学依据。

关键词: 乌洛托品; 不确定度; 豆腐皮; 液相色谱质谱法

Evaluation of uncertainty in determination of urotropine in Tofu skin

BAI Xiang¹, WEI Yong-Lin², HU Zeng-Bin¹, PANG Li-Ming¹, DONG Shu-Fen¹,
ZHANG Xue-Zhong¹, FENG Lei¹, NIU Zhi-Rui^{1*}

(1. Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, National Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, Kunming 650223, China; 2. Yunnan Institute of Measuring and Testing Technology, Kunming 650228, China)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate the uncertainty in determination of urotropine in Tofu skin by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Method** According to JJF 1059.12-2012 *Evaluation and expression of uncertainty in measurement*, the uncertainty sources in determination of urotropine in Tofu skin were analyzed. Furthermore, the combined uncertainty and expanded uncertainty were calculated based on the established mathematic models. **Results** The major uncertainty source in this method was liquid chromatography-mass spectrometer equipment. When the urotropine residual content in Tofu skin was 0.523 mg/kg, the expanded uncertainty was 0.018 mg/kg, and the urotropine residual content was expressed as (0.523 ± 0.018) mg/kg ($k=2$). **Conclusion** The method can provide a scientific basis for the measurement results and the reliability of the method of liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of urotropine residual in Tofu skin.

KEY WORDS: urotropine; uncertainty; Tofu skin; liquid chromatography-mass spectrometry

1 引 言

乌洛托品(urotropine)为白色吸湿性结晶粉末或无色

有光泽的菱形结晶体, 低毒, 可作为抗菌药物使用。在酸性条件下, 乌洛托品还可以部分分解成甲醛, 在人体内可还原为醇, 对人体的肾脏、肝脏等器官造成损害。卫生部

*通讯作者: 牛之瑞, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: bullnzh@163.com

*Corresponding author: NIU Zhi-Rui, Engineer, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, National Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, No.23, East Jiaochang Road, Wuhua District, Kunming 650223, China. E-mail: bullnzh@163.com

发布的第四批《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单》中做出规定,乌洛托品属于违法添加的非食用物质。但个别不法厂家使用乌洛托品以替代吊白块,用来延产品长保质期^[1]。

目前,我国现行有效的检测标准只有 SN/T 2226-2008《进出口动物源性食品中乌洛托品残留量的检测方法》^[2],该方法适用于鸡肉、鸡内脏和猪肉中乌洛托品的检测确证。而豆制品因为与肉类基质差别较大,该检测方法并不能满足豆制品样品的检测需求。本研究对该方法前处理部分进行了改进,用于测定豆腐皮中的乌洛托品,并对不确定度进行评估,以确定影响检测结果的因素^[3],为类似检测的测量不确定度评定工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UFLC-20A 液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司); API3200 三重四极杆串联质谱联用仪(美国 AB 公司); 色谱柱: CAPCELL PAK(CR) (2.1 mm×100 mm, 5 μm, 日本 SHISEIDO 公司)、Shim-pack XR-ODS(3.0 mm×75 mm, 2.2 μm, 日本 SHIMADZU 公司); Analyst 质谱工作站(美国 AB 公司); GL-12B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); N-EVAP 氮吹仪(美国 Organomation 公司); CPA225D 电子天平(德国 Sartorius 公司); 十二孔固相萃取装置(美国 Waters 公司); Omni 均质机(美国 Pulsafeeder 公司); Cleanert PCX 固相萃取小柱(美国 Agela Technologies 公司)。

乌洛托品标准品(99.5%, 德国 Dr. EhrenstorferGmnH 公司); 乙腈、甲醇、乙酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氨水(分析纯, 重庆川东化工有限公司); 乙酸铵(色谱纯, 美国 Fluka 公司); 高氯酸(分析纯, 金鹿化工有限公司); 18.2 MΩ 超纯水由赛多利斯超纯水机生产; 豆腐皮样品购买于市场。

2.2 检测方法

称取 10 mg 乌洛托品标准品于 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容,即为 100 mg/L 的标准物质储备溶液,避光保存于-20 ℃冰箱中,备用。准确量取标准储备溶液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用 0.1%乙酸-乙腈溶液(8:2, V:V)定容,即为浓度相当于 1.0 μg/mL 的标准中间液,使用时,以 0.1%乙酸-乙腈(8:2, V:V)稀释成 5.0、10.0、50.0、100.0、500.0 μg/L 供高效液相色谱-串联质谱测定^[1]。

样品的制备:取代表性样品用组织捣碎机捣碎,准确称取 2 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入 0.4%高氯酸溶液定容至 10 mL,用均质机以 10000 r/min 均质 2 min 后,再以 10000 r/min 离心 5 min,取上清液于另一 50 mL 离心管中,加入 10 mL 以水饱和的石油醚,用漩涡振荡器振摇 5 min,再以 10000 r/min 离心 5 min,用滴管吸去有机相,留水相备用。

净化:固相萃取柱使用前依次用 3 mL 甲醇和 0.4%高氯酸溶液预洗,并保持柱体湿润。准确吸取 3.0 mL 水相溶液过固相萃取柱,再用 3.0 mL 0.1%乙酸淋洗固相萃取柱,弃去流出液,在 15 mm Hg 以下减压抽 3 min 使柱体干涸;最后用 6.0 mL 氨水-甲醇溶液(5:95, V:V)洗脱,收集洗脱液,并在 40 ℃下用氮吹仪浓缩至近干,准确取 1.0 mL 0.1%乙酸-乙腈(8:2, V:V)溶解残渣,经 0.22 μm 滤膜过滤,供液相色谱-质谱/质谱测定。

色谱条件:流动相 A 相为 10 mmol/L 乙酸铵溶液(乙酸调 pH 值到 4.5),流动相 B 相为乙腈,流动相梯度见表 1。流速为 0.4 mL/min;柱温为 40 ℃;进样量 5 μL。

表 1 流动相的梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间/min	0.0	1.5	2.0	3.0	3.5	6.0
B%	40	40	80	80	40	10

质谱条件:扫描方式:电喷雾负离子模式(ESI⁻);检测方式:多反应监测(MRM);喷雾电压:5500 eV;气帘气:10.0 Psi;碰撞气:10.0 Psi;去溶剂温度:450 ℃;雾化气:60.0 Psi;辅助气:50.0 Psi;其他参考条件参见表 2。

3 输入量的标准不确定度

3.1 标准品溶液配制过程产生的不确定度^[3-9]

(1)乌洛托品标准品的纯度标示为 99.5%,由标准品纯度引入的不确定度为:

$$U_{rel}(std_A) = \frac{(1 - Cs)}{\sqrt{3}} = \frac{(1 - 99.5\%)}{\sqrt{3}} = 0.2887\%。$$

(2)天平允许的最大误差为±0.01 mg,称取乌洛托品标准品 10.00 mg,取矩形分布,引入相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(std_B) = \frac{0.01}{\sqrt{3} \times 10.00} = 0.0577\%。$$

表 2 乌洛托品的质谱分析参数
Table 2 MS parameters for urotropine analysis

成分	离子对 (m/z)	扫描时间/ms	碰撞电压/eV	去簇电压/eV
乌洛托品	141.1/112.1*	100	40	17
	141.1/85.1	100	40	22

注:标*为定量离子对。

(3)稀释标准品时,使用 1 mL 移液管准确移取 1 mL 标准储备液于 100 mL 容量瓶中,得到浓度为 1 μg/mL 的标准中间液(C_m),引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(std_b) = \sqrt{U_{rel}(std_{1\text{ mL 移液管}})^2 + U_{rel}(std_{100\text{ mL 容量瓶}})^2} = \sqrt{\left(\frac{0.008}{\sqrt{3} \times 1}\right)^2 + \left(\frac{0.1}{\sqrt{3} \times 100}\right)^2} = 0.4655\%$$

标准溶液稀释过程中的不确定度如表 3 所示。

(4)标准物质引入的总不确定度

由于上述各因素互不相关,乌洛托品标准溶液配制所产生的不确定度为:

$$U_{rel}(std) = 0.73\%$$

3.2 液相色谱质谱仪的不确定度^[3-14]

考虑到仪器检测过程中的不确定度,直接引用云南省剂量测试技术研究院出具的检定证书作为评价依据。仪器的定量偏差应≤3%。所以以 3%作为计算仪器标准偏差。

$$U_{rel}(m) = \frac{0.0300}{2} = 1.50\%$$

3.3 由样品制备所引起的不确定度

(1)天平校准允许的最大误差为±0.0001 g,称取样品 2 g,取矩形分布,引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(m) = \frac{0.0001}{\sqrt{3} \times 2} = 0.0029\%$$

(2)使用 10 mL(V_1)容量瓶(A 级)允许的最大误差为±0.02 mL,取矩形分布,由对照品定容体积引入杆对标准的不确定度:

$$U_{rel}(V_1) = \frac{u(V_1)}{V_1} = \frac{0.02}{\sqrt{3} \times 10} = 0.1155\%$$

(3) 5 mL 移液管允许的最大误差为±0.05 mL,由对照品定容体积引入杆对标准的不确定度:

$$U_{rel}(V_2) = \frac{u(V_2)}{V_2} = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times 5} = 0.5774\%$$

(4)固相萃取净化后,经氮气吹干的过程,使用 1 mL(V_3)移液管,其允许的最大误差为 0.008 mL,取矩形分布,由氮吹引入的相对标准不确定度:

$$U_{rel}(V_3) = \frac{u(V_3)}{V_3} = \frac{0.008}{\sqrt{3} \times 1} = 0.4619\%$$

(5)由样品制备过程引入的总不确定度

由于上述各因素互不相关,样品的前处理过程的不确定度为:

$$U_{rel}(pre) = 0.40\%$$

3.4 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $U_{rel}(\rho)$

本研究对 5 个不同浓度的乌洛托品标准溶液进行测定,每个浓度测定 1 次,共测定 5 次($n=5$)。测得浓度与峰面积的对值见表 4。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行拟合,得到的回归方程为: $Y=261X-507(r^2=1.0000)$ (见表 5)。根据公式(1)计算纵坐标标准溶液峰面积预测值所产生的标准误差 $S(y)=14.24$ 。

对样品溶液进行 6 次重复测定($p=6$),待测样溶液按回归方程计算的平均含量为 315 μg/L(见表 5)。根据公式(2)计算最小二乘法拟合标准曲线的过程引入的标准不确定度:

$$U(\rho) = \frac{374.77}{261} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{5} + \frac{(315-133)^2}{(6.75-133)^2 + (9.92-133)^2 + (48.1-133)^2 + (100-133)^2 + (500-133)^2}} = 1.04 \mu\text{g/L}$$

则拟合曲线引入的相对标准不确定度为: $U_{rel}(\rho)=1.04/315 \times 100=0.33\%$ 。

$$S(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}} \tag{1}$$

表 3 标准溶液稀释过程中的不确定度
Table 3 Uncertainty resulting from the preparation of standard solution by temperature variation

标准浓度 (μg/L)	容量瓶 V (mL)	容量瓶的允 许误差(mL)	移液管 (mL)	移液管的允 许误差(mL)	移液管移 取量(mL)	容量瓶相对标 准不确定度(%)	移液管相对标 准不确定度(%)	合成相对标准不确 定度 $U_{rel}(std_D)$ (%)
C_m : 1.0	—	—	—	—	—	—	—	—
C_1 : 5	100.0	0.10	0.5	0.005	0.5	0.0577	0.5774	
C_2 : 10	100.0	0.10	1.0	0.008	1.0	0.0577	0.4619	
C_3 : 50	100.0	0.10	5	0.050	1.0	0.0577	0.5774	0.6518
C_4 : 100	10.0	0.020	1.0	0.008	1.0	0.1155	0.4619	
C_5 : 500	10.0	0.020	5.0	0.050	5.0	0.1155	0.5774	

注: 所用容量瓶及移液管均为 A 级。

式中: n 为标准曲线测定的总点数; y_i 为各标液浓度对应的响应值; y 为各标液浓度代入直线方程计算出的理论值。

$$\mu(\rho)=\frac{S(y)}{b}\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{n}+\frac{(x_0-\bar{x})^2}{\sum_{j=1}^n(x_j-\bar{x})^2}} \quad (2)$$

式中: n 为标准曲线测定的总点数(拟合总点数); p 为样品重复测定的次数; x_0 为待测样品以曲线校正所得含量均值计(μg); x 为各标准溶液峰面积代入直线方程计算出的理论值($\mu\text{g/L}$); $\bar{X}$ 为标准曲线各点含量的平均值(μg); b 为直线斜率。

4 测量不确定度的评定与报告^[10-15]

4.1 各分量的相对标准不确定度汇总

各分量的相对标准不确定度汇总见表 6。

4.2 合成标准不确定度

$$U_{crel}(X)=\sqrt{U_{rel}(std)^2+U_{rel}(m)^2+U_{rel}(pre)^2+U_{rel}(\rho)^2}$$
$$=\sqrt{0.0073^2+0.0150^2+0.0040^2+0.0033^2}=0.0175=1.75\%$$

4.3 相对扩展不确定度

95%置信水平下, 取 $k=2$, 则:

$$U_{rel}=k\times U_{crel}(X)=2\times 1.75\%=3.50\%$$

结合称样量和定容体积, 计算得到样品中乌洛托品的含量为 0.523 mg/kg, 则扩展不确定度为:

$$U=0.523\times 3.50\%=0.018\text{ mg/kg}$$

4.4 测定结果

按照该方法测定豆腐皮中乌洛托品的结果为:

$$X=(0.523\pm 0.018)\text{ mg/kg}; k=2$$

5 结论与讨论

本研究对豆腐皮中乌洛托品残留量测定的不确定度来源进行了较全面的分析, 根据各分量的相对标准不确定度汇总, 液相色谱质谱仪的设备不确定度是不确定度的主要来源, 其他影响因素较小。样品中乌洛托品的残留量为 $(0.523\pm 0.018)\text{ mg/kg}$ ($k=2$)。

表 4 样品测定结果
Table 4 Determination results of samples

	1	2	3	4	5	均值	标准偏差/%
称样量 $m(\text{g})$	2.0001	2.0066	2.0103	2.0004	2.0116	2.0058	0.005
测得量($\mu\text{g/L}$)	334	327	323	289	301	315	0.019
含量(mg/kg)	0.557	0.543	0.536	0.482	0.499	0.523	0.032

表 5 校准曲线
Table 5 Calibration curve

线性横坐标 $X_i(\mu\text{g/L})$	线性纵坐标数据 Y_i	直线方程	理论值 X	理论值 Y	(Y_i-Y)
5	1260	$Y=261X-507(r^2=1.0000)$	6.75	798	462
10	2090		9.92	2103	-13
50	12100		48.1	12543	-443
100	25700		100	25593	107
500	130000		500	129993	7
均值 133					

表 6 乌洛托品测定中各分量的相对标准不确定度
Table 6 Relative uncertainty of each component in the determination of urotropine

不确定度分量	来源	评定方法	量值
$U_{rel}(std)$	标准物质引入的总不确定度	B 类评定	0.0073
$U_{rel}(m)$	LC-MS/MS 的设备不确定度	B 类评定	0.015
$U_{rel}(pre)$	样品制备过程引入的总不确定度	A 类评定	0.040
$U_{rel}(\rho)$	标准曲线拟合引入的相对标准不确定度	A 类评定	0.0033

参考文献

- [1] 马雪涛, 牛之瑞, 冯雷, 等. 离子交换固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定豆制品中乌洛托品残留量[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 166-169.
Ma XT, Niu ZR, Feng L, *et al.* Determination of urotropine residue in processed soybean products by ion exchange solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2014, 35(10): 166-169.
- [2] SN/T 2226-2008 进出口动物源性食品中乌洛托品残留量的检测方法[S].
SN/T 2226-2008 Determination of urotropine residue in foodstuffs of animal origin for import and export.LC-MS/MS method [S].
- [3] JJF 1059-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [4] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [5] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].
- [6] GB/T 12806-2011 实验室玻璃仪器单标线容量瓶[S].
GB/T 12806-2011 Laboratory glassware-One-mark volumetric flasks [S].
- [7] 范巧成. Excel 在线性回归法测量不确定度评定中的应用[J]. 理化分析-化学分册, 2005, 1(9): 678-680.
Fan QC. Use of excel for evaluation of uncertainty of the results calculated from linearity regression [J]. Phys Test Chem Anal Part B (Chem Anal), 2005, 1(9): 678-680.
- [8] CNAS-CL01 检测和校准实验室能力认可准则(ISO/IEC 17025:2005) [S].
CNAS-CL01 Accreditation criteria for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2005) [S].
- [9] CNAS-GL06 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL06 Guidance on evaluating of the uncertainty in chemical analysis [S].
- [10] JJF 1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S].
JJF 1135-2005 Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement [S].
- [11] 费文静, 丁慧, 许纪锋, 等. 麻油中皂化值的测量不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2199-2203.
Fei WJ, Ding H, Xu JF, *et al.* Evaluation of measurement uncertainty of the saponification value in sesame oil[J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(6): 2199-2203.
- [12] 程家丽, 刘婷婷, 马彦宁, 等. 液相色谱法测定保健食品中番茄红素的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11): 4653-4658.
Cheng JL, Liu TT, Ma YN, *et al.* Uncertainty evaluation of the determination of lycopene in health food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(11): 4653-4658.
- [13] 高杨, 郑玉山, 巴特尔. 气相色谱-串联质谱法测定牛奶中有机磷残留的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 4237-4241.
Gao Y, Zheng YS, Ba TR. Uncertainty evaluation of organophosphorus residues in milk determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 4237-4241.
- [14] 陈子凡. 自上而下法评定固相酶联免疫吸附法测定食用油中黄曲霉毒素 B1 的不确定度[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2226-2231.
Chen ZF. Uncertainty evaluation of determination of aflatoxin B1 in edible oil by ELISA with top-down approach [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(6): 2226-2231.
- [15] ISO/IEC 17025:2005-5-15 检测和校准实验室能力的通用要求[S].
ISO/IEC 17025:2005-5-15 Accreditation criteria for the competence of testing and calibration laboratories [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



白 祥, 主要从事食品安全管理工作。
E-mail: bullnznr@163.com



牛之瑞, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: bullnznr@163.com