

超高效液相色谱法测定配制酒中糖精钠的不确定度分析

李 珊¹, 杨 宁², 胡廷皓¹, 曹仲厚¹, 肖佳芳¹, 蔡 亮^{1*}

(1. 长江航运总医院, 武汉 430000; 2. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430000)

摘 要: **目的** 分析超高效液相色谱法测定配制酒中糖精钠的不确定度。**方法** 依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》和 CNSA-GL06-2018《化学分析中不确定度的评估指南》中的规定和要求, 分析糖精钠含量测定过程中的各种不确定度的来源。**结果** 当配制酒中糖精钠的含量为 0.105 g/kg 时, 其扩展不确定度为 0.010 g/kg($k=2$)。**结论** 建立标准曲线的过程中引入的不确定度最大, 其次是标准溶液, 样品前处理过程以及测量重复性实验引入的不确定度相对较小。

关键词: 高效液相色谱法; 调制酒; 糖精钠; 不确定度

Uncertainty analysis for the determination of saccharin sodium in mixed wine by ultra performance liquid chromatography

LI Shan¹, YANG Ning², HU Ting-Hao¹, CAO Zhong-Hou¹, XIAO Jia-Fang¹, CAI Liang^{1*}

(1. General Hospital of the Yangtze River Shipping, Wuhan 430000, China;

2. College of Food science and engineering Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the uncertainty for the determination of saccharin sodium in mixed wine by ultra performance liquid chromatography. **Methods** According to the regulation and requirement of JJF 1059.1-2012 *Evaluation and expression of uncertainty in measurement* and CNSA-GL06 *Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis*, various sources of uncertainty in the measurement process of saccharin sodium content were analyzed. **Results** When the content of saccharin sodium in the prepared wine was 0.105 g/kg, the expanded uncertainty was 0.010 g/kg ($k=2$). **Conclusion** The greatest uncertainty was introduced during the establishment of the standard curve, followed by less uncertainty in the standard solution, the uncertainty introduced by sample pretreatment and measurement repeatability was relatively small.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography; mixed wine; saccharin sodium; uncertainty analysis

1 引 言

糖精钠作为一种人工合成甜味剂, 因其甜度高、不被

人体代谢吸收、在各种食品生产过程中都很稳定等特点广泛应用于各类食品中^[1]。配制酒是以发酵酒或蒸馏酒为酒基, 加入可食用的辅料或食品添加剂, 进行直接浸泡或复

基金项目: 武汉市卫生计生科研基金资助(WG18Y01)

Fund: Supported by Scientific Research Project of Wuhan Municipality Health and Family Planning Commission (WG18Y01)

*通讯作者: 蔡亮, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 314544818@qq.com

*Corresponding author: CAI Liang, Engineer, General Hospital of The Yangtze River Shipping, Huiji Road No.5, Jiangnan District, Wuhan 430000, China. E-mail: 314544818@qq.com

蒸馏、调配、混合或再加工制成的、已改变了其原有酒基风格的酒^[2]。基于糖精钠的毒理学数据^[3-5]及糖精钠在食品中的滥用现象^[1,6-10], GB 2760-2017 中规定了部分食品中糖精钠的最大使用量, 其中配制酒为 0.15 $\mu\text{g/g}$ ^[11]。糖精钠的限量很低, 需要保证测定结果的准确性和可靠性, 而不确定度是评定检测结果的重要指标。本文参考 GB 5009.28-2016 中配制酒中糖精钠的测定方法^[12]、CNSA-CL06《化学分析中不确定度的评估指南》^[13]和 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[14]等进行不确定度的分析, 以期发现可能影响糖精钠测定结果的因素, 为日常实验检测质量控制提供科学可靠的依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UPLC H-CLASS 超高效液相色谱仪(配有紫外检测器, 美国 Waters 公司); 1810a 超纯水仪(重庆摩尔水处理设备有限公司)。

水中二水糖精钠标准储备溶液(浓度 1000 mg/L, 北京坛墨质检科技有限公司); 乙酸铵(分析纯, 纯度 $\geq 98.0\%$, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 纯度 $\geq 99.9\%$, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 实验用水为纯水。

乙酸铵溶液(20 mmol/L): 称取 1.54 g 乙酸铵, 加入适量水溶解, 用水定容至 1000 mL, 经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

2.2 实验方法

准确称取约 2 g(精确到 0.001 g)配制酒试样于 50 mL 容量瓶中, 并用水定容至刻度, 混匀。取适量上清液过 0.22 μm 滤膜, 待液相色谱测定。

2.3 色谱条件

色谱柱: Dikma Silversil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇+乙酸铵溶液=7:93(V:V); 流速: 1 mL/min; 检测波长 230 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

3 结果与分析

3.1 不确定度数学模型

按照上述实验方法, 配制酒中糖精钠含量的不确定度数学模型见下公式:

$$X(\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{m \times 1000}$$

式中:

X —试样中糖精钠的含量, g/kg;

C —从标准曲线得出的试样液中待测液的质量浓度, mg/L;

V —试样定容体积, mL;

m —试样质量, g;

1000—由 mg/kg 转换为 g/kg 的换算因子。

3.2 不确定度来源

从配制酒经稀释定容后液相色谱法进行检测过程及数学模型可知, 不确定度的来源包括以下 4 个方面的分量: (1)配制标准溶液引入的不确定度; (2)建立校准曲线引入的不确定度; (3)样品前处理包括: 样品称量及定容引入的不确定度; (4)样品重复性测量引入的不确定度。

3.3 不确定度分量的量化计算

3.3.1 糖精钠标准溶液引入的不确定度分量 $u_r(C)$

糖精钠标准溶液的浓度是 1000 mg/L, 其标准物质证书上的不确定度是 2 mg/L($k=2$), 则糖精钠标准溶液的相对

$$\text{不确定度为 } u_r(C) = \frac{2}{2 \times 1000} = 0.00100。$$

3.3.2 建立标准曲线引入的不确定度分量 $u_r(S)$

(1) 储备液稀释过程引入的不确定度 $u_r(S_1)$

使用 5 mL 刻度吸管移取 5.0 mL 的 1000 mg/L 的标样液至 50 mL 容量瓶中并定容, 其浓度为 100 mg/L。则其不确定度有以下方面组成:

① 5 mL 刻度吸管引入的不确定度

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[16]规定 5 mL 刻度吸管(A 级)吸取 5 mL 时, 容量允差为 ± 0.025 mL, 取矩形分布, 则刻度移液管引入的相对不确定度为: $u_r(a) = \frac{0.025}{\sqrt{3} \times 5} = 0.00289。$

② 50 mL 容量瓶引入的不确定度

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[16]规定, 20 $^{\circ}\text{C}$ 时 50 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为 ± 0.05 mL, 取矩形分布, 则容量瓶体积带来的相对不确定度为: $u_r(b) = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times 50} = 0.000577。$

③ 温度变化引入的不确定度

本实验室有健康环境空调, 温度变化的极值范围为 (20 ± 4) $^{\circ}\text{C}$, 则在极端温度情况下 50 mL 容量瓶膨胀带来的体积变化为 $50 \times 4 \times 2.1 \times 0.0001$, 按照均匀分布计算由温度波动对定容体积影响而引入的相对不确定度为:

$$u_r(c) = \frac{50 \times 4 \times 2.1 \times 0.0001}{\sqrt{3} \times 50} = 0.000485。$$

④ 本组分量合成

以上 3 个分量相关性较小, 则储备液稀释过程带来的不确定度分量合成为:

$$\begin{aligned} u_r(S_1) &= \sqrt{u_r(a)^2 + u_r(b)^2 + u_r(c)^2} \\ &= \sqrt{0.0144^2 + 0.000408^2 + 0.000485^2} \\ &= 0.0144 \end{aligned}$$

(2) 标准系列溶液稀释过程引入的不确定度 $u_r(S_2)$

采用逐级稀释的方法将 100 mg/L 中间液配制成 50、25、10、5、1 mg/L 的标准系列工作液。稀释过程中采用

了 5 mL 刻度吸管移取 5 mL 体积 3 次, 5 mL 刻度吸管移取 4 mL 体积 1 次, 2 mL 刻度吸管 1 次, 最终定容至 10 mL 容量瓶中。则其不确定度有以下方面组成:

①2 mL 单标线吸管引入的不确定度

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[16]规定 2 mL 单标线吸管(A 级)的容量允差为±0.010 mL, 取矩形分布, 则刻度移液管引入的相对不确定度分量为: $u_r(a) = \frac{0.010}{\sqrt{3} \times 2} = 0.00289$ mL。

②5 mL 刻度吸管引入的不确定度

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[16]规定 5 mL 刻度吸管(A 级)的容量允差为±0.025 mL, 取矩形分布, 则刻度移液管吸取 5 mL 和 4 mL 溶液引入的相对不确定度分量分别为:

$$u_r(b_1) = \frac{0.025}{\sqrt{3} \times 5} = 0.00289, u_r(b_2) = \frac{0.025}{\sqrt{3} \times 4} = 0.00361。$$

③10 mL 容量瓶引入的不确定度

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[16]规定 10 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为±0.020 mL, 取矩形分布, 则容量瓶引入的相对不确定度分量为: $u_r(c) = \frac{0.020}{\sqrt{3} \times 10} = 0.00115。$

④温度变化引入的不确定度

本实验室有健康环境空调, 温度变化的极值范围为 (20±4) °C, 20 °C 时水的体积膨胀系数为 2.1×10^{-4} , 则在极端温度情况下玻璃器具膨胀带来的体积变化为(量取体积×4× 2.1×10^{-4})mL, 按照均匀分布计算由温度波动引入的相对不确定度为: $u_r(d) = \frac{\text{量取体积} \times 4 \times 2.1 \times 0.0001}{\sqrt{3} \times \text{量取体积}} = 0.000485。$

⑤本组分量合成

以上 4 个分量相关性较小, 则标准系列溶液稀释过程带来的不确定度分量合成:

$$\begin{aligned} u_r(S_2) &= \sqrt{u_r(a)^2 + u_r(b_1)^2 \times 3 + u_r(b_2)^2 + u_r(c)^2 \times 5 + u_r(d)^2 \times 10} \\ &= \sqrt{0.00289^2 + 0.00289^2 \times 3 + 0.00361^2 + 0.00115^2 \times 5 + 0.000485^2 \times 10} \\ &= 0.00744 \end{aligned}$$

(3) 建立校准工作曲线引入的不确定度 $u_r(L)$

配制一系列标准溶液, 每一浓度进样 1 次, 结果如表 1。

校准曲线为: $A_i = B_1 C_i + B_0$

式中 A_i —第 i 个标准溶液的峰面积;

C_i —第 i 个标准溶液的浓度;

B_1 —斜率。

B_0 —截距。

表 1 糖精钠标准溶液浓度与对应的峰面积
Table 1 Saccharin sodium concentration of standard solution with the corresponding peak area

标液序号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]
糖精钠的浓度 $C_i(\text{mg/L})$	1	5	10	25	50
峰面积, A_i	56442.5	373090.1	788501.0	2031219.5	4105841.6

线性关系按照最小二乘的拟合结果:

$A=82780C-35568$, 相关系数 r^2 为 1。

故校准工作曲线的标准不确定度计算公式为:

$$\begin{aligned} u(L) &= \frac{s(y)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}} \\ s(y) &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a + bC_i)]^2}{n - 2}} \\ \bar{C} &= \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{n} \end{aligned}$$

式中: $u(L)$ —由拟合直线求 C_0 时产生的不确定度;

$s(y)$ —由拟合直线求得的 A 与相应 A_i 测定值之差按贝塞尔公式求出的标准偏差;

p —样品溶液的测定次数 $p=2$;

n —标准溶液的测定总次数, $n=5$;

A_i —标准溶液峰面积测定值;

B_1 —常数, 其值为 82780;

B_0 —常数, 其值为-35568;

C_i —标准溶液中糖精钠的浓度, mg/L;

$\bar{C}$ —标准溶液中糖精钠的浓度的测定平均值, 20 mg/L;

C_0 —样品溶液中糖精钠的浓度, 4.2 mg/L;

将表 1 中的数据代入上述公式, 计算得: $s(y)=6825.54$, $u(L)=0.07624$ mg/L,

则校准曲线拟合带来的相对不确定度为: $u_r(L) = u(L)/C_0 = 0.07624/4.2 = 0.01815。$

(4) 子分量的合成

综上, 标准曲线配置过程引入的各不确定度分量合成可以使用简化的方和根公式计算:

$$\begin{aligned} u_r(S) &= \sqrt{u_r(S_1)^2 + u_r(S_2)^2 + u_r(L)^2} \\ &= \sqrt{0.0144^2 + 0.0391^2 + 0.0182^2} \\ &= 0.0455 \end{aligned}$$

3.3.3 样品前处理引入的不确定度分量 $u_r(P)$

称取 2 g 配制酒, 加水定容至 50 mL 容量瓶, 取适量上清液过 0.22 μm 滤膜, 待液相色谱测定。

(1) 样品称重过程天平校准引入的不确定度 $u_r(P_1)$

称量使用电子天平型号 OHAUS-jdv215cd, 由检定证书, 最大允差为 0.5 mg, 样品质量为 2 g, 按均匀分布

表 2 配制酒中糖精钠的测定结果
Table 2 Results of saccharin sodium in mixed wine

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
糖精钠含量/(g/kg)	0.1047	0.1047	0.1048	0.1052	0.1047	0.1055	0.1050	0.1051	0.1052	0.1046
算术平均值/(g/kg)	0.105									
贝塞尔标准差 S/(g/kg)	0.0003									

考虑, 则有相对标准不确定度为: $u_r(P_1) = \frac{0.5}{\sqrt{3} \times 2000} = 0.000144$ 。

(2) 样品定容引入的不确定度 $u_r(P_2)$

JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15]和 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[16]规定 50 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为±0.050 mL, 取矩形分布, 则容量瓶引入的相对不确定度分量为 $u_r(P_2) = \frac{0.050}{\sqrt{3} \times 50} = 0.000577$ 。

(3) 子分量的合成

综上, 样品前处理过程引入的各不确定度分量合成可以使用简化的方和根公式计算:

$$\begin{aligned} u_r(P) &= \sqrt{u_r(P_1)^2 + u_r(P_2)^2} \\ &= \sqrt{0.000144^2 + 0.000577^2} \\ &= 0.000588 \end{aligned}$$

3.3.4 测量重复性引入的不确定度分量 $u_r(R)$

本实验还受到很多其他难以量化因素的影响, 如仪器设备的稳定性、仪器读取结果的差异等, 为此通过平行测定同一样品 10 次, 得出实验结果见表 2。

因此, 样品重复性测量的相对标准不确定度为 $u_r(R) = S / \sqrt{10} / 0.105 = 0.00093$ 。

3.4 不确定度分量汇总及合成不确定度计算

3.4.1 不确定度分量汇总

将 3.3 部分已经量化的相对不确定度子分量列入下表 3。

表 3 相对不确定度分量汇总表

序号	不确定度来源	相对不确定度 u_r
3.3.1	标准溶液 $u_r(C)$	0.00100
3.3.2	标准曲线 $u_r(S)$	0.0455
3.3.3	样品前处理 $u_r(P)$	0.000588
3.3.4	测量重复性实验 $u_r(R)$	0.00093

3.4.2 不确定度的合成

表 3 列出的 4 个主要子分量之间不存在相关性或相关性较弱, 则按照不确定度合成的简化公式计算如下:

$$\begin{aligned} u_r(C) &= \sqrt{u_r(C)^2 + u_r(S)^2 + u_r(P)^2 + u_r(R)^2} \\ &= \sqrt{0.001^2 + 0.0455^2 + 0.000588^2 + 0.00093^2} \\ &= 0.0455 \end{aligned}$$

3.5 扩展不确定度 U 计算及结果报告

3.5.1 扩展不确定度计算

由于测试样品中糖精钠含量的算术平均值为 0.105 g/kg, 则合成标准不确定度为:

$$u(X) = u_r(C) \times 0.105 = 0.0455 \times 0.105 = 0.00478 \text{ g/kg}。$$

取包含因子 $k=2$, 则根据扩展不确定度计算公式 $U = ku(X)$, 得出扩展不确定度为:

$U = 2u(X) = 0.00956 \text{ g/kg}$, 考虑到与检测结果保留相同的小数位, 则修约为 $U \approx 0.010 \text{ g/kg}$ 。

3.5.2 结果报告

液相色谱法测定配制酒中糖精钠的含量, 测量结果表示为: $C = (0.105 \pm 0.010) \text{ g/kg}$, $k=2$ 。

4 结 论

通过对配制酒中的糖精钠不确定度的分析, 发现建立标准曲线的过程中引入的不确定度最大, 其次是标准溶液, 而样品前处理过程以及测量重复性实验引入的不确定度相对较小。因此, 在实际的检测过程中, 应使用高精度的量具, 增加标准系列溶液的测定次数等措施来减小引入的不确定度, 从而保证实验结果的准确性。

参考文献

[1] 刘娟娟, 舒静, 张莉. 糖精钠行业存在问题和解决措施[J]. 价值工程, 2015, 7: 305-306.
Liu J, Shu J, Zhang L. The problems and some measures of sodium saccharin industry [J]. Value Eng, 2015, 7: 305-306.
[2] NY/T 2104-2011 绿色食品 配制酒[S].
NY/T 2104-2011 Green food-Mixed wine [S].
[3] 付佳, 吴赤蓬, 邹志飞. 苯甲酸钠与糖精钠、柠檬黄对 L-929 细胞联合毒性的研究[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(1): 47-50.
Fu J, Wu CP, Zou ZF. Sodium benzoate and saccharin sodium, citric yellow joint toxicity to the cells of L-929 [J]. J Toxicol, 2010, 24(1): 47-50.
[4] Manfred K, Kathleen M, Ruth K. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues [J]. Compreh Rev Food Sci Food Saf, 2006, 5(2): 35-47.
[5] Arnold DL, Moodie CA, Grice HC, et al. Long-term toxicity of ortho-touenesulfonamide and sodium saccharin in the rat [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1980, 52(1): 113-152.
[6] 阳柳蓉, 陈西津. 冷饮、饮料中糖精钠、甜蜜素检测及管理对策[J]. 职业与健康, 2002, 18(7): 42-43.

- Yang LR, Chen XJ. The detection and management countermeasures of saccharin sodium, cyclamate in cold drink and drink [J]. Occup Health, 2002, 18(7): 42-43.
- [7] 包懿, 石金娥, 刘斌, 等. 高效液相色谱/二极管阵列法快速测定白酒、配制酒与葡萄酒中 5 种人工合成甜味剂[J]. 分析测试学报, 2017, 36(5): 674-678.
- Bao Y, Shi JE, Liu Bin, *et al.* Rapid determination of five artificial sweeteners in white spirit, mixed liquor and wine by high performance liquid chromatography/diode array detector [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(5): 674-678.
- [8] 梁宇, 区硕俊. UPLC-Q-TOF-MS 法同时测定配制酒中的 3 种甜味剂[J]. 当代化工, 2018, 47(3): 502-504, 508.
- Liang Y, Qu SJ. Determination of three synthetic sweeteners in blending liquor by ultra performance liquid chromatography-high resolution quadrupole time of flight mass spectrometer [J]. Contemp Chem Ind, 2018, 47(3): 502-504, 508.
- [9] 王承平. 我国白酒行业质量调研报告[J]. 质量与标准化, 2015, 2: 33-36.
- Wang CP. The liquor industry quality survey report in our country [J]. Qual Saf, 2015, 2: 33-36.
- [10] 王竹天, 蒋定国, 杨大进, 等. 2003 年~2004 年中国食品添加剂监测结果与分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 99-103.
- Wang ZT, Jiang DG, Yang DJ, *et al.* Analysis of results of surveillance on use of food additives in China during 2003-2004 [J]. Chin J Food Hyg, 2006, 18(2): 99-103.
- [11] GB 2760-2017 食品添加剂使用标准[S].
- GB 2760-2017 Standards of using food additives [S].
- [12] GB 5009.28-2016 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定[S].
- GB 5009.28-2016 Determination of benzoic acid and sorbic acid and saccharin sodium in food [S].
- [13] CNSA-CL06 化学分析中不确定度的评估指南[S].
- CNSA-CL06 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [14] JJF1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
- JJF1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [15] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
- JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [16] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
- JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



李 珊, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测技术。
E-mail: lishanyin@163.com



蔡 亮, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 314544818@qq.com

“发酵技术在食品中的应用”专题征稿函

作为众多食品种类的一种, 发酵食品因其独特的风味受到消费者的普遍欢迎。发酵是一种传统的食品储存与加工方法, 是指利用有益微生物加工制造的一类食品, 包括发酵乳制品、酒类、泡菜、酱油、食醋、豆豉等。由于其独特的加工方式, 发酵食品或存在一定的安全隐患, 可能会影响人体健康。

鉴于此, 本刊特别策划了“发酵技术在食品中的应用”专题, 由河南工业大学黄继红教授担任专题主编。专题将围绕(1)菌种的选育和保藏; (2)发酵工艺的条件优化, 发酵机制, 发酵工程动力学; (3)发酵食品的分析与检测; (4)发酵食品的安全性评价及风险评估类或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可, 专题计划在 2018 年 12 月出版。

本刊主编国家风险评估中心吴永宁研究员与本专题主编黄继红教授特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2018 年 11 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式(注明专题):

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部