

气相色谱法测定槟榔中甜蜜素含量的 不确定度评定

袁 河¹, 陈慧鹏¹, 夏延斌², 赵志友¹, 江日初³

(1. 湖南省槟榔加工与食用安全工程技术研究中心, 湖南宾之郎食品科技有限公司, 湘潭 411100;
2. 湖南农业大学食品科技学院, 长沙 410128; 3. 湘潭市食品药品监督管理局, 湘潭 411100)

摘 要: **目的** 评定气相色谱法测定食用槟榔中环己基氨基磺酸钠(又名甜蜜素)的不确定度评定方法。**方法** 根据气相色谱法定量测定食用槟榔中甜蜜素含量的测定原理, 较全面的考虑整个测定过程的不确定度来源, 建立结果不确定度评定的数学模型, 并探讨其测定结果不确定度。**结果** 在 95%的置信区间下, 当槟榔中甜蜜素含量为 6.19 g/kg 时, 其扩展不确定度为 0.18 g/kg, $k=2$ 。**结论** 槟榔中甜蜜素的检测不确定度主要来源为标准曲线的拟合。

关键词: 槟榔; 甜蜜素; 不确定度; 气相色谱法

Uncertainty evaluation of sodium cyclamate content in *Areca catechu* L. by gas chromatography

YUAN He¹, CHEN Hui-Peng¹, XIA Yan-Bin², ZHAO Zhi-You¹, JIANG Ri-Chu³

(1. Hunan Areca Processing and Edible Safety Engineering Technology Research Center, Hunan Bingzhilang Food Science and Technology Co. Ltd., Xiangtan 411100, China; 2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. Xiangtan Food and Drug Administration, Xiangtan 411100, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of sodium cyclamate (also known as cyclamate) in edible betelnut by gas chromatography. **Methods** Based on quantitative determination of sodium cyclamate in edible betelnut by gas chromatography, and more comprehensive consideration of the source of uncertainty throughout the measurement process, a mathematical model for evaluating the uncertainty of results was established and the uncertainty of its measurement results was explored. **Results** At the 95% confidence interval, when the content of sodium cyclamate in the sample was 6.19 g/kg, its extended uncertainty was 0.18 g/kg ($k=2$). **Conclusion** The main source of uncertainty for the detection of cyclamate in betel nut is the fitting of the standard curve.

KEY WORDS: *Areca catechu* L.; sodium cyclamate; uncertainty; gas chromatography

基金项目: 湖南省科技创新计划项目(2017TP2028, 2017ZK3138)、长株潭国家自主创新示范区专项(2017SK2430)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Project of Hunan(2017TP2028, 2017ZK3138), and National Independent Innovation Demonstration Zone Project of CHANGsha-Zhuzhou-Xiangtan (2017SK2430)

*通讯作者: 袁河, 硕士, 工程师, 主要研究食品质量与安全控制。E-mail: yh285146066@163.com

*Corresponding author: YUAN He, Master, Engineer, Hu'nan Bingzhilang Food Science and Technology Co., Ltd., NO.30, Jili Road, Jiuhua Economic Development Zone, Xiangtan City, Hunan Province. E-mail: yh285146066@163.com

1 引言

环己基氨基磺酸钠俗称甜蜜素,是食用槟榔中添加的主要人工合成的甜味剂之一,如果经常食用甜蜜素含量超标的饮料或其他食品,会对人体的肝脏和神经系统造成危害^[1-3]。GB 2760-2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》中规定凉果类(槟榔添加剂用量按凉果类执行)甜蜜素(以环己基氨基磺酸计)的最大使用量为 8.0 g/kg^[4]。因甜蜜素具有甜感好,甜度倍数高(其甜度是蔗糖的 30~40 倍),价格适宜等优点,被广泛应用于食用槟榔中。食品中甜蜜素的测定方法主要有:气相色谱法^[5,6]、高效液相色谱-质谱法^[7,8]、离子色谱法^[9]等。但由于食用槟榔的复杂性及地域性,鲜有相关机构深入研究准确测定槟榔中甜蜜素含量的方法。因此,本研究在前人研究基础上,根据 GB 5009.97-2016《食品中环己基氨基磺酸钠的测定》^[10]中气相色谱法(FID 检测器)测定食用槟榔中甜蜜素的含量,再依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[11],对测量过程中产生的不确定度进行分析评定,以期今后该项目的准确测定提供理论参考。

2 材料与方法

2.1 试剂、仪器及材料

正庚烷、亚硝酸钠、氯化钠及硫酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

7890B 气相色谱仪,配 FID 检测器(美国安捷伦公司);KQ-700E 超声波清洗机(昆山美美超声仪器有限公司);十万分之一分析天平(奥豪斯仪器有限公司);

槟榔样品(购买于湖南市场);甜蜜素标准品(中国食品药品检定研究院)。

2.2 实验方法

采用 GB 5009.97-2016《食品中环己基氨基磺酸钠的测定》第一法对食用槟榔中甜蜜素含量进行测定。

用粉碎机将槟榔粉碎,称取 5.00 g 槟榔置于 150 mL 具塞锥形瓶中,用 100 mL 量筒加入 100 mL 超纯水,采用频率为 40 kHz,功率为 700 W 的超声波仪于室温超声提取 30 min,用移液管移取 5.00 mL 提取液加入 25 mL 离心管中,再分别加入 5.00 mL 正庚烷、2.50 mL (50 g/L)亚硝酸钠和 2.50 mL (200 g/L)的硫酸溶液,摇匀后冰浴 30 min(期间振摇 3~5 次),反应完后加入 2.5 g 氯化钠,涡旋 1 min 再离心 5 min 后取上层正庚烷萃取液用气相色谱仪测定。准确移取 5.00 mL 系列标准溶液按上述方法衍生化。样品与标样在相同的条件下利用气相色谱质谱火焰离子化检测器进行分离及分析,以保留时间定性,外标法定量。

2.3 数学模型的建立

食用槟榔中甜蜜素含量均按(1)计算:

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

式中: X —试样中待测组分含量, g/kg;

c —由标准曲线得出的样液中待测组分的浓度, mg/mL;

V —试样提取液总体积, mL;

m —试样质量, g。

3 结果与分析

3.1 不确定度分量的主要来源

食用槟榔中甜蜜素含量测定的不确定度主要来自于:标准储备液、标准曲线的拟合、样品的定容、样品称量、样品测量重复性及仪器数据处理系统^[12-14]。

3.2 不确定度的评估

3.2.1 标准储备液引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(c)$

标准储备液引入的不确定度主要包括:标准物质纯度、标准物质的称量及标准物质的定容。

1) 标准物质纯度引入的不确定度 $u(p)$

甜蜜素标准物质证书给出其纯度为 $P=99.5\%$, $u(p)=\pm 0.5\%$ ($k=2$), 则其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(p)=u(p)/2=0.0025。$$

2) 标准物质称量引入的不确定度 $u(m)$

分析天平证书实际分度值 $d=0.01$ mg, 区间半宽度 $\alpha_m=0.005$ mg, 假设其为矩形分布, 包含因子 $k_m=\sqrt{3}$, 则其标准不确定度为:

$$u(m)=\alpha_m/\sqrt{3}=2.89 \times 10^{-3} \text{ mg}。$$

称取甜蜜素标准物质的质量为 250.00 mg, 则称量产生的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(m)=u(m)/m=0.0012。$$

3) 标准物质的定容引入的不确定度 $u(V)$

(1) 容量瓶引入的不确定度

甜蜜素标准品溶解定容至 100 mL 容量瓶中, 根据中华人民共和国国家计量检定规程 JJG 196-2006^[15], (25±1) °C 时 100 mL 单标线容量瓶(A 级)容量允差为±0.10 mL, 假设其为矩形分布, 则 100 mL 容量瓶的不确定度为:

$$u(V_1)=\frac{0.10 \text{ mL}}{\sqrt{3}}=0.058 \text{ mL};$$

$$u_{rel}(V_1)=\frac{0.058 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}=0.00058。$$

(2) 温度引入的不确定度

容量瓶的校准温度为 20 °C, 实验室温度在(20±5) °C

之间变化。液体的体积膨胀明显大于容量瓶的体积膨胀, 因此只需考虑液体的体积膨胀。因此容量瓶溶液温度与校准时温度不同所引起的体积变化为 $100\text{ mL} \times 5\text{ }^{\circ}\text{C} \times 2.08 \times 10^{-4}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1} = 0.104\text{ mL}$ ($2.08 \times 10^{-4}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 为水的膨胀系数), 假设其为矩形分布, 则温度对定容体积影响所引入的不确定度为:

$$u(V_2) = \frac{0.104\text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.060\text{ mL};$$

$$u_{\text{rel}}(V_2) = \frac{0.060\text{ mL}}{100\text{ mL}} = 0.00060。$$

因此定容体积引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_1) + u_{\text{rel}}^2(V_2)} = 0.00083;$$

由此得出标准储备液引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(p) + u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V)} = 0.0026。$$

3.2.2 标准曲线的拟合引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(g)$

标准曲线引入的不确定度包括定容容器和标准曲线的拟合。

1) 配制标准溶液所用的容器引入的不确定度 $u(b)$

(1)移液管引入的不确定度

用 2.0 mL 分度移液管从标准溶液中分别准确移取 0.10 、 0.20 、 0.40 、 0.80 、 1.20 、 1.60 mL 溶液置于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度。根据中华人民共和国国家计量检定规程 JJG196-2006, $(25 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时 2 mL 分度移液管(A 级)的容量允差为 $\pm 0.012\text{ mL}$, 假设其为矩形分布, 则 2 mL 分度移液管的不确定度为:

$$u(b_1) = \frac{0.012\text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.0069\text{ mL};$$

$$u_{\text{rel}}(b_1) = \frac{0.0069\text{ mL}}{1.6\text{ mL}} = 0.0043。$$

(2)容量瓶引入的不确定度

10 mL 单标线容量瓶(A 级)的容量允差为 $\pm 0.025\text{ mL}$, 假设其为矩形分布, 则 10 mL 单标线容量瓶的不确定度为:

$$u(b_2) = \frac{0.025\text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.014\text{ mL};$$

$$u_{\text{rel}}(b_2) = \frac{0.014\text{ mL}}{10\text{ mL}} = 0.0014。$$

因此容器引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(b) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(b_1) + u_{\text{rel}}^2(b_2)} = 0.0045。$$

2) 标准曲线拟合引入的不确定度 $u(q)$

实验对 6 个不同浓度标准工作液进行测定, 所得峰面积与对应浓度原始记录见表 1。

采用最小二乘法对甜蜜素的浓度 X 与其对应的平均峰面积 Y 进行线性回归, 得到甜蜜素标准曲线: $Y = 271.6789X + 19.3631$, $r = 0.9992$ 。

本例对待测试样进行了 6 次测量, 由标准曲线方程求得待测萃取液中甜蜜素的浓度 $c_{\text{甜蜜素}}$, 则 $c_{\text{甜蜜素}}$ 的标准不确定度为:

$$u(q) = \frac{s(A)}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_{\text{甜蜜素}} - \bar{c}_{\text{甜蜜素}})^2}{Scc}}$$

式中: $s(A) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (b + ac_j)]^2}{n - 2}}$ 为标准工作液峰面积残差的标准差;

$$\bar{c} = \frac{\sum_{j=1}^n c_j}{n} \text{ 为标准工作液的平均浓度;}$$

$$Scc = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2 \text{ 为标准溶液含量残差的平方和;}$$

n 为标准溶液的测量次数, 本实验为 18; p 为 $c_{\text{甜蜜素}}$ 的测量次数, 本实验为 6; a 为标准曲线的斜率, 本实验为 271.6789; b 为标准曲线截距, 本实验为 19.3631; A 为标准品的峰面积。

$c_{\text{甜蜜素}}$ 的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(q) = \frac{u(q)}{c_{\text{甜蜜素}}}$$

由最小二乘法拟合曲线求得 $c_{\text{甜蜜素}}$ 时所产生的标准不确定度 $u(q)$ 和相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(q)$ 见表 2。

表 1 标准曲线原始记录
Table 1 Original record of the standard curve

编号	甜蜜素浓度/(mg/mL)	峰面积 AU			
		1	2	3	平均值
1	0.025	96.25	95.24	95.85	95.78
2	0.05	161.80	160.77	161.17	161.25
3	0.10	294.10	294.30	294.33	294.24
4	0.20	576.25	575.21	576.40	575.95
5	0.30	822.14	823.57	822.62	822.77
6	0.40	1107.25	1105.14	1105.91	1106.10

表 2 标准曲线不确定度结果表

Table 2 Standard curve results of the uncertainty

组分	c 甜蜜素/(mg/mL)	$s(A)$	S_{cc}	$u(q)$	$u_{rel}(q)$
甜蜜素	0.31	8.29	2.21	0.0029	0.94%

由此得出标准曲线拟合引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(g)=\sqrt{u_{rel}^2(b)+u_{rel}^2(q)}=1.04。$$

3.2.3 样品定容引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(d)$

(1)量筒引入的不确定度

由校准证书给出的 100 mL 量筒(A 级)的不确定度为 0.2 mL, 假设其为矩形分布, 则 100mL 量筒引入的不确定度为:

$$u(d_1)=\frac{0.2\text{ mL}}{\sqrt{3}}=0.12\text{ mL};$$

$$u_{rel}(d_1)=\frac{0.12\text{ mL}}{100\text{ mL}}=0.0012。$$

(2)温度引入的不确定度

量筒溶液温度与校准时温度不同所引起的体积变化为 $100\text{ mL}\times 5\text{ }^{\circ}\text{C}\times 2.08\times 10^{-4}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}=0.104\text{ mL}(2.08\times 10^{-4}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 为水的膨胀系数), 假设其为矩形分布, 则温度对体积影响所引入的不确定度为:

$$u(d_2)=\frac{0.104\text{ mL}}{\sqrt{3}}=0.060\text{ mL};$$

$$u_{rel}(d_2)=\frac{0.060\text{ mL}}{100\text{ mL}}=0.00060。$$

因此样品定容引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(d)=\sqrt{u_{rel}^2(d_1)+u_{rel}^2(d_2)}=0.0013。$$

3.2.4 样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(z)$

称取槟榔样品 5.00 g, 校准证书给出分析天平允差为 0.005 g, 假设其为矩形分布, 故由天平在样品称量时引入的不确定度为:

$$u(z)=\frac{0.005\text{ g}}{\sqrt{3}}=0.0029\text{ g};$$

$$u_{rel}(z)=\frac{0.0029\text{ g}}{5.00\text{ g}}=0.00058。$$

3.2.5 样品测量重复性引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(e)$

分别称取 6 份同一槟榔样品 5.00 g, 测得样品中甜蜜素的含量, 假设其为矩形分布, 结果见表 3。

由表 3 得出测量重复性引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(e)=\frac{s(e)}{x}=0.0069。$$

3.2.6 仪器处理系统引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(y)$

仪器处理系统引入的不确定度包括峰面积和溶液进样量的不确定度。

表 3 样品 6 次平行测定结果

Table 3 Results of 6 parallel determinations of samples

	甜蜜素
1	6.20
2	6.24
3	6.12
4	6.20
5	6.24
6	6.16
平均含量 $\bar{x}$ /(g/kg)	6.19
标准偏差 $s(e)$ /(g/kg)	0.043

(1)根据仪器参数分析, 气相色谱仪峰面积积分处理的最大误差为 1%, 假设其为矩形分布, 则此项峰面积的相对不确定度为:

$$u_{rel}(y_1)=\frac{1\%}{\sqrt{3}}=0.0058。$$

(2)根据仪器参数分析, 进样器不确定度为 0.3%, 假设其为矩形分布, 则此项进样器的相对不确定度为:

$$u_{rel}(y_2)=\frac{0.3\%}{\sqrt{3}}=0.0017。$$

因此仪器引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(y)=\sqrt{u_{rel}^2(y_1)+u_{rel}^2(y_2)}=0.0060。$$

3.2.7 合成标准不确定度

上述各分量相对不确定度合成甜蜜素含量的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(x)=\sqrt{u_{rel}^2(c)+u_{rel}^2(g)+u_{rel}^2(d)+u_{rel}^2(z)+u_{rel}^2(e)+u_{rel}^2(y)}=0.014$$

3.2.8 扩展不确定度

在 95%置信区间下, 取包含因子 $k=2$, 得相对扩展不确定度为:

$$U_{rel}(X)=k\times u_{rel}(x)=2\times 0.014=0.028。$$

槟榔样品中甜蜜素含量为 6.19 g/kg, 得扩展不确定度为:

$$U=6.19\text{ g/kg}\times 0.028=0.18\text{ g/kg}。$$

综上可得槟榔样品中甜蜜素含量不确定度报告为: $(6.19\pm 0.18)\text{ g/kg}(k=2)。$

4 结 论

气相色谱法测定食用槟榔中环己基氨基磺酸钠, 当取样量为 5.0 g, $k=2$ (95%置信度), 测量槟榔中甜蜜素的含量结果为: $C=(6.19\pm 0.18)\text{ g/kg}。$

槟榔中甜蜜素的测定的不确定度来源主要为: 标准

储备液、标准曲线的拟合、样品的定容、样品称量、样品测量重复性及仪器数据处理系统。从不确定度的评定结果来看: 标准曲线的拟合引入的不确定度最大, 可以通过以下途径降低测定结果的不确定度:

(1)多维护保养仪器, 尽量提高仪器的精密密度; (2)增强实验人员的技术能力, 提高其操作稳定性; (3)尽量保持实验温度的稳定性, 减少随机误差。

参考文献

- [1] 仁绍坤. 酱油中环己基磺酸钠的测定[J]. 食品安全导刊, 2016, (10): 101-102.
Ren SK. Determination of sodium cyclamate in soy sauce [J]. Chin Food Safe Magaz, 2016, (10): 101-102.
- [2] 程水连, 王泽科, 祝正辉. 气相色谱外标法测定食品中甜蜜素含量方法的改进[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 85-87.
Cheng SL, Wang ZK, Zhu ZH. An improved method for determination of cyclamate in food by gas chromatography [J]. Food Mach, 2013, 29(2): 85-87.
- [3] 朱怀远, 庄亚东, 熊晓敏, 等. 离子色谱法直接测定食品添加剂中的甜蜜素[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 173-176.
Zhu HY, Zhuang YD, Xiong XM, *et al.* Determination of cyclamate in food additive by ion chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(2): 173-176.
- [4] 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 the use of food additives [S].
- [5] 周正香. 食品中甜蜜素气相色谱方法测定的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(4): 274-276, 280.
Zhou ZX. Study on determination of cyclamate in food by gas chromatography [J]. Food Sci, 2012, 37(4): 274-276, 280.
- [6] 陈冬纯, 邓后勤. 气相色谱法测定饮料中甜蜜素的条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 84-87.
Chen DC, Deng HQ. Optimization of determination of cyclamate in beverage by gas chromatography [J]. Food Mach, 2014, 30(2): 84-87.
- [7] 肖晶, 方从容, 杨大进, 等. 高效液相色谱-质谱法测定酒中甜蜜素含量的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 254-256.
Xiao J, Fang CR, Yang DJ, *et al.* Determination of saccharin in wine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(3): 254-256.
- [8] 彭祺, 葛乐勇, 寿谦, 等. 液质联用法和高效液相色谱法测定黄酒中甜蜜素的对比研究[J]. 酿酒科技, 2013, (7): 23-27, 32.

Peng Q, Ge LY, Shou Q, *et al.* A comparative study on the determination of cyclamin in yellow rice wine by liquid mass spectrometry and high performance liquid chromatography [J]. Liquor-Mak Sci, 2013, (7): 23-27, 32.

- [9] 辛若竹, 康鑫琦. 离子色谱法测定食品中甜蜜素含量的研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(10): 92-98.
Xin RZ, Kang XQ. Determination of cyclamate in food by ion chromatography [J]. China Cond, 2015, 40(10): 92-98.
- [10] GB 5009.97-2016 食品中环己基氨基磺酸钠的测定[S].
GB 5009.97-2016 Determination of sodium cyclamate in food [S].
- [11] 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].
- [12] 赵妮鸿. 顶空-气相色谱法测定亚麻籽油中溶剂残留量的不确定度分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(19): 5223-5227.
Zhao YH. Uncertainty evaluation for the determination of solvent residue in linseed oil by headspace-gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(19): 5223-5227.
- [13] 苏美玲, 刘海旭, 丁勇宝, 等. 气相色谱法测定粮食中四种有机磷农药残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5618-5622.
Su ML, Liu HX, Ding YB, *et al.* Uncertainty evaluation of determination of four kinds of organophosphorus pesticide in grain by gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(21): 5618-5622.
- [14] 杨少博, 魏连通, 谢健, 等. 顶空-气相色谱法测定饮用水中三氯乙醛的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 3944-3947.
Yang SB, Wei LT, Xie J, *et al.* Evaluation of uncertainty of determination of trichloroaldehyde in drinking water by headspace gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(15): 3944-3947.
- [15] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification rules for common glass gauges [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



袁 河, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全控制。
E-mail: yh285146066@163.com