

高效液相色谱法测定食品中脱氢乙酸的不确定度评定

陈晨^{1*}, 陈妍¹, 倪炜华¹, 鲍晓瑾¹, 朱洪亮¹, 屠振华²

(1. 嘉兴市食品药品检验检测院, 嘉兴 314000; 2. 国家食品行业生产力促进中心, 北京 100000)

摘要: **目的** 评定高效液相色谱法测定食品中脱氢乙酸测定的不确定度。**方法** 依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》及新版国标方法 GB 5009.121-2016《食品安全国家标准 食品中脱氢乙酸的测定》, 建立评定脱氢乙酸不确定度的模型, 对检测过程中各分量因素进行不确定度的分析评定。**结果** 当样品中脱氢乙酸的含量为 0.243 g/kg 时, 其扩展不确定度为 0.070 g/kg, $k=2$ 。**结论** 在整个实验过程中, 标准品的配制及高效液相色谱仪的稳定性是影响实验结果的最主要因素, 需严格把控。

关键词: 不确定度; 脱氢乙酸; 高效液相色谱法

Evaluation of uncertainty for the determination of dehydroacetic acid in food by high performance liquid chromatography

CHEN Chen^{1*}, CHEN Yan¹, NI Wei-Hua¹, BAO Xiao-Jin¹, ZHU Hong-Liang¹, TU Zhen-Hua²

(1. Jiaxing Institute for Food and Drug Control, Jiaxing 314000, China;
2. China Food Industry Productivity Promotion Center, Beijing 100000, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of dehydroacetic acid in food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** According to JJF 1059.1-2012 *Measurement uncertainty evaluation and expression* and the new national standard method, GB 5009.121-2016 *Detection of dehydroacetic acid in food*, the model for assessing the uncertainty of dehydroacetic acid was established, to evaluate the uncertainty of component factors in dehydroacetic acid detection. **Results** When the content of dehydroacetic acid in the sample was 0.243 g/kg, the extended uncertainty was 0.070 g/kg, $k=2$. **Conclusion** During the whole test, the preparation of standard solution and the stability of HPLC are the key to the accurate detection of dehydroacetic acid in food which need to be strictly controlled

KEY WORDS: uncertainty; dehydroacetic acid; high performance liquid chromatography

1 引言

脱氢乙酸以固态形式最为常见, 呈无色结晶或淡黄色粉末, 学名为 3-乙酰基-6-甲基-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮, 是继

山梨酸、苯甲酸后新一代广谱食品防腐剂, 低毒高效^[1-3], 可抑制导致食品饮料等腐败变质的霉菌、大肠杆菌等微生物的生长, 目前常以钠盐的形式广泛应用于鱼类、肉类、水果、蔬菜、糕点类等的防腐保鲜和保存^[4,5]。过量食用食

基金项目: 北京市东城区优秀人才培养资助项目(2014080536381G011)

Fund: Supported by the talented people Foundation of Beijing Dongcheng District (2014080536381G011)

*通讯作者: 陈晨, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: chenc1221@163.com

*Corresponding author: CHEN Chen, Master, Engineer, Jiaxing Food & Drug Inspection and Testing Institute, No.39, Qinyi Road, Jiaxing 314000, China. E-mail: chenc1221@163.com

品中的脱氢乙酸易对人体健康和安全造成极大危害,现阶段我国在 GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》^[6]中对脱氢乙酸在食品中的使用范围及最大使用量都作出了明确规定。最新 2016 版国标方法 GB 5009.121-2016《食品安全国家标准 食品中脱氢乙酸的测定》^[7]于 2017 年 3 月 1 日开始实施,新版国标方法规定了 2 种检测食品中脱氢乙酸的方法-气相色谱法和液相色谱法。其中,液相色谱法为第二法,其原理是:试样中的脱氢乙酸用氢氧化钠溶液提取,经脱脂、去蛋白处理后过膜,用配有二极管阵列检测器(photo diode array detector, DAD)的高效液相色谱仪测定。

评定不确定度,是检测质量结果是否准确的标志,是衡量检测结果可行性、可比性和可接受性的重要指标^[8]。测量不确定度的大小,反映了一个实验室的检测水平,定量地说明了实验室(包括人员、测量设备和环境条件)测量能力水平。为有效减少实验过程中产生的误差降低不确定度,提高检测结果的准确性^[9-11],本研究基于最新版国标方法 GB 5009.121-2016 中的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)与标准 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[12],采用 HPLC 法测定食品中的脱氢乙酸,分析评价了实验过程中各影响因素产生的不确定度。确定了在测定脱氢乙酸中影响实验结果的最主要因素,为测定其他食品添加剂不确定度提供方法参考及科学评价地可行性建议,对提高检测准确度,保证实验可靠性具有指导意义^[13-15]。

2 材料与方法

2.1 主要仪器与试剂

ME 203E/02 电子天平[分度值 0.001 g,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Chorus 1 超纯水仪(法国 ELGA 公司);SPD-M20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

七水合硫酸锌(分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司);氢氧化钠(分析纯,杭州萧山化学试剂厂)。

脱氢乙酸标准物质(纯度 99.9%,北京曼哈格生物科技有限公司)。

2.2 方法

根据 GB 5009.121-2016 第二法中酱菜、发酵豆制品试样制备提取步骤,称取适量试样(酱菜)于离心管中,加 10 mL 水、5 mL 硫酸锌溶液(120 g/L),用氢氧化钠(20 g/L)调 pH 至 7.5,转移至 25 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,超声 10 min,4000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.45 μm 有机滤膜后上机测试。

2.3 标准曲线的配制

称取 50 mg 脱氢乙酸标准品于 50 mL 容量瓶中,用 5 mL 氢氧化钠溶液(20 g/L)溶解,用水定容配制浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。分别准确吸取 0.01、0.05、0.10、

0.50、1.00 mL 脱氢乙酸标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用水定容,配制成浓度分别为 1、5、10、50、100 mg/L 的标准曲线浓度点(4 °C 保存)。

2.4 数学模型

待测样品中脱氢乙酸含量计算公式见式(1):

$$X=(c_1-c_0)V/m \quad (1)$$

式中: X —试样中脱氢乙酸的含量, g/kg;

c_1 —试样液中脱氢乙酸质量浓度, mg/mL;

c_0 —空白试样液中脱氢乙酸质量浓度, mg/mL;

V —试样溶液总体积, mL;

m —试样质量, g。

3 结果与分析

3.1 不确定度来源分析

由测量模型可知,检测过程中产生的不确定度主要包括:样品称量、样液定容、标准溶液配制、仪器精密性、标准工作曲线拟合、样品重复性测试。

3.2 各分量不确定度的评定

3.2.1 样品称量导致的不确定度

(1) 称量所用电子分析天平的最大允许误差为 ± 0.001 g,按均匀分布 $k=\sqrt{3}$,由于二次称量所得,则由电子天平误差引起的不确定度 $u(m_1)$

$$u(m_1)=\sqrt{2 \times \left(\frac{0.001}{\sqrt{3}}\right)^2}=8.2 \times 10^{-4} \text{ g};$$

(2) 所用天平为数显式,其分辨率为 0.001,由于分辨率较大,重复测试的不确定度可忽略,按平均分布,则由分辨率引起的不确定度 $u(m_2)$:

$$u(m_2)=\frac{0.001}{2 \times \sqrt{3}}=2.9 \times 10^{-4} \text{ g};$$

(3) 样品称量导致的合成不确定度为:

$$u(m)=\sqrt{u^2(m_1)+u^2(m_2)}=8.7 \times 10^{-4} \text{ g};$$

相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m)=u(m)/m=3.5 \times 10^{-4}.$$

3.2.2 样液定容导致的不确定度

(1) 使用 25 mL 单标线容量瓶(A 级),允差为产生的不确定度为 ± 0.03 mL^[16],按均匀分布, $k=\sqrt{3}$, $u(V_{25})=\frac{0.03}{\sqrt{3}}=0.017$ mL;

(2) 实验室环境温度为 20 °C,水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$,按均匀分布, $k=\sqrt{3}$,则温度变化引起的标准不确定度:

$$u(T)=\frac{2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 5}{\sqrt{3}}=0.0030 \text{ mL};$$

(3) 样液定容时的合成不确定度为:

$$u(V)=\sqrt{0.017^2+0.0030^2}=0.017\text{ mL};$$

相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V)=u(V)/V=6.8\times10^{-4}。$$

3.2.3 标准溶液配制产生的不确定度

(1) 标准物质引入的不确定度

所用标准物质脱氢乙酸的纯度为 99.9%, 由标准物质证书得知相对标准不确定度为±2.0%, $k=2$, 则:

$$u(c_s)/c_s=\frac{2.0\%}{2}=0.01;$$

(2) 标准工作液配制产生的不确定度

主要由移液器引入不确定度, 根据 JJG196-2006《常用玻璃仪器检定规程》^[16], 按均匀分布 $k=\sqrt{3}$, 计算各计量器引入的相对标准不确定度如表 1 所示。

(3) 标样称量引入的不确定度

a. 称量用的电子分析天平的最大允许误差为 ±0.0001 g, 按均匀分布, $k=\sqrt{3}$, 由于二次称量所得, 则

$$u(m_1)=\sqrt{2\times\left(\frac{0.0001}{\sqrt{3}}\right)^2}=8.2\times10^{-5}\text{ g};$$

b. 所用天平为数显式, 其分辨率为 0.0001, 由于分辨率较大, 重复测试的不确定度可忽略, 按平均分布, 则:

$$u(m_2)=\frac{0.0001}{2\times\sqrt{3}}=2.9\times10^{-5}\text{ g};$$

c. 标样称量导致的不确定度合成为:

$$u(m)=\sqrt{u^2(m_1)+u^2(m_2)}=8.7\times10^{-5}\text{ g};$$

相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m)=u(m)/m=0.0017;$$

标准工作溶液引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c)=\sqrt{\frac{u_{\text{rel}}(c)^2+u_{\text{rel}}(m)^2+u_{\text{rel}}(0.1)^2+u_{\text{rel}}(0.5)^2+u_{\text{rel}}(1)^2}{+u_{\text{rel}}(5)^2+u_{\text{rel}}(10)^2+5u_{\text{rel}}(100)^2}}=0.141。$$

3.2.4 仪器定量引入的不确定度

样品进样量为 10 μL, 查得高效液相色谱的允许误差为 0.12%, 按均匀分布, $k=\sqrt{3}$, 则

$$u_{\text{rel}}(q)=\frac{0.12\%}{\sqrt{3}}=6.9\times10^{-4}\text{ g}。$$

3.2.5 标准工作曲线拟合引入的标准不确定度

由标准工作曲线 $Y=a+bX$, 则 X 的不确定度为:

$$u_c^2(X)=c^2(Y)u^2(Y)+c^2(a)u^2(a)+c^2(b)u^2(b)\quad (2)$$

其中 Y 为取系列标准工作溶液 X_i 的平均值代入回归直线方程的计算值。

系列标准工作溶液 X_i 的测定结果见表 2。标准工作曲线为 $Y=3.12497\times10^7X-28695.23098(r=0.9998875)$ 。

(1) 回归曲线的标准偏差 $u(Y)$

$$u(Y)=SY/X=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n(Y_i-Y_{ij})^2}{m\times n-2}}\quad (3)$$

式中: Y_{ij} ——气相色谱仪的各点峰面积;

Y_i ——回归曲线的计算值;

n ——测量点数目;

m ——每测量点重复测量次数。

则: $u(Y)=2230。$

灵敏度系数: $c(Y)=1/b=1/3.12497\times10^7=3.2\times10^{-8}$;

(2) 由分散性引起的回归曲线斜率的标准偏差及不确定度 $u(b)$

$$u(b)=s(b)=\frac{uY}{\sqrt{\sum_{i=1}^n(X_i-\bar{X})^2}}=11448;$$

$$\text{灵敏度系数 } c(b)=\frac{X}{b}=-\frac{Y-a}{b^2}=-5.32\times10^{-9};$$

(3) 由分散性引起的回归曲线截距的标准偏差及不确定度 $u(a)$

$$u(a)=s(a)=SY/X=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^nX_i^2}{nm\sum_{i=1}^n(X_i-X)^2}}=38138.5;$$

灵敏度系数 $c(a)=-1/b=-3.2\times10^{-8}$ 。

则标准工作曲线拟合引入的标准不确定度 $u_c(X)=1.22\times10^{-3}。$

表 1 计量器引入的相对标准不确定度
Table 1 The relative uncertainty of meter

计量器/mL	吸量管 0.1	吸量管 0.5	吸量管 1	吸量管 5	吸量管 10	容量瓶 50	容量瓶 100
容量允差/mL	0.0002	0.0029	0.0046	0.025	0.05	0.05	0.058
相对标准不确定度	0.0032	0.0042	0.0055	0.015	0.029	0.0029	0.058

表 2 系列标准工作溶液峰面积测定结果
Table 2 Determination of peak area of series standard working solutions

标准工作溶液浓度 $X_i/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1
	16875	130844	283541	1500653	3112063
峰面积($\times10^{-6}$)	16773	132584	287778	1497553	3116960
	16638	133539	289622	1505009	3115971
峰面积平均值($\times10^{-6}$)	16762	132322.3	286980.3	1501071.7	3114998

3.2.6 样品测定重复性引入的不确定度

同一样品加标做 6 个平行样, 根据公式(1), 计算 6 个平行样中脱氢乙酸含量数据如表 3 所示。

表 3 脱氢乙酸含量
Table 3 The content of dehydroacetic acid

序号	1	2	3	4	5	6
含量/(g/kg)	0.240	0.240	0.246	0.245	0.243	0.242

加标样品: 加标量 0.250 g/kg, 实测值: 0.243 g/kg。

标准偏差: $S(\bar{W}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 2.53 \times 10^{-3} \text{ g/kg};$

相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(\bar{W}) = S(\bar{W})/\bar{W} = 6.32 \times 10^{-4}.$

3.3 合成不确定度

$$u(Y)/Y = \sqrt{\frac{u_{\text{rel}}(m)^2 + u_{\text{rel}}(V)^2 + u_{\text{rel}}(c)^2}{+u_{\text{rel}}(q)^2 + u_{\text{rel}}(X)^2 + u_{\text{rel}}(\bar{W})^2}} = 0.14$$

则 $u(Y) = 0.035 \text{ g/kg}$ 。包含因子 $k=2$, 则扩展不确定度为 $U(Y) = 2u(Y) = 0.070 \text{ g/kg}$ 。当测定样品中脱氢乙酸含量为 0.243 g/kg , 高效液相色谱仪测定食品中脱氢乙酸的结果表示为 $Y = (0.243 \pm 0.070) \text{ g/kg}$, $k=2$ 。

4 结 论

本研究根据 GB 5009.121-2016 方法, 利用高效液相色谱仪测定食品中脱氢乙酸, 并依据 JJF 1059.1-2012 方法对实验过程中各影响因素产生的不确定度进行分析评定。本方法测量不确定度的来源主要包括环境因素、量具、人员操作以及仪器精密性与稳定性等。其中, 标准溶液的配制及仪器的稳定性是影响实验结果的最主要因素。因此在实验过程中需严格把控标准品配制过程, 定期检定仪器设备, 保持实验环境的一致性, 提升操作人员的专业技能, 减少人为误差, 以提高检测结果的准确性。

参考文献

[1] 曾金, 王天地. 食品中脱氢乙酸分析方法的最新研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15): 82-83.
Zeng J, Wang TD. Recent research progress on analytical methods of dehydroacetic acid in food [J]. J Anhui Agric Sci, 2016, 44(15): 82-83.
[2] 张小芳, 付大友. 高效液相色谱法同时测定食醋和酱油中的 6 种防腐剂和甜味剂[J]. 中国调味品, 2018, 43(9): 147-150.
Zhang XF, Fu DY. Simultaneous determination of six preservatives and sweeteners in vinegar and soy sauce by HPLC [J]. China Cond, 2018, 43(9): 147-150.
[3] 张倩勉, 邓玉秀, 刘星, 等. HPLC 法同时检测多种防腐剂的研究[J]. 食品科技, 2018, (12): 341-344, 348.
Zhang QM, Deng YX, Liu X, et al. The research of simultaneous determination of preservatives by HPLC [J]. Food Sci Technol, 2018, (12): 341-344, 348.
[4] 周纯洁, 牟兴川, 朱永红, 等. 高效液相色谱法同时测定酱油中 13 种防腐剂[J]. 中国调味品, 2016, (2): 107-109, 113.

Zhou CJ, Mou XC, Zhu YH, et al. Simultaneous determination of 13 preservatives in soy sauce by high performance liquid chromatography [J]. China Cond, 2016, (2): 107-109, 113.
[5] 刘锐萍, 朱娜, 杨帛, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中多种防腐剂含量方法的不确定度评定[J]. 饮料工业, 2015, 18(6): 30-34.
Liu RP, Zhu N, Yang B, et al. Evaluation of the uncertainty for the simultaneous determination of preservatives in foods using HPLC method [J]. Bever Ind, 2015, 18(6): 30-34.
[6] GB 2760-2014 国家食品安全标准 食品添加剂限量[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Limit of additives in food [S].
[7] GB 5009.121-2016 食品中脱氢乙酸的测定[S].
GB 5009.121-2016 The detection of dehydroacetic acid in food [S].
[8] 郝丽丽, 任慧. 浅谈检测实验室的测量不确定度评定[J]. 航空标准化与质量, 2013, (4): 49-52.
Hao LL, Ren H. Discussion on the evaluation of uncertainty of testing laboratory [J]. Aeronaut Stand Qual, 2013, (4): 49-52.
[9] 徐调金, 林晓飞, 陈含笑, 等. 高效液相色谱法测定酱油中山梨酸的不确定度评定[J]. 中国调味品, 2015, (12): 60-63, 72.
Xu YJ, Lin XF, Chen HX, et al. Uncertainty evaluation of sorbic acid in soy sauce detected by HPLC [J]. China Condiment, 2015, (12): 60-63, 72.
[10] 李卓, 陈冬, 舒蕊华, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中辣椒素的不确定度评定[J]. 中国调味品, 2017, 42(5): 135-137, 148.
Li Z, Chen D, Shu RH, et al. Uncertainty evaluation for determination of capsaicin in cayenne pepper by HPLC [J]. China Cond, 2017, 42(5): 135-137, 148.
[11] 陈毓芳, 林海丹, 官咏仪, 等. 高效液相色谱法测定饮料中乙基麦芽酚含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2175-2180.
Chen YF, Lin HD, Guan YY, et al. Uncertainty evaluation for determination of ethyl maltol in beverages by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(9): 2175-2180.
[12] 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].
[13] 赵欣, 李强. 高效液相色谱法测定面包、饼干等烘焙类食品中的脱氢乙酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3464-3468.
Zhao X, Li Q. Quantitative determination of dehydroacetic acid in bread, cookies and other baked food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(13): 3464-3468.
[14] Lee MJ, Lee JM, Kim S, et al. Simultaneous analysis and measurement of uncertainty estimation of six isoflavones in Cheonggukjang by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2019, 289(8): 139-134.
[15] 赵天珍. 气相色谱法测定月饼中脱氢乙酸的不确定度评定[J]. 食品机械, 2011, 27(4): 84-86.
Zhao TZ. Uncertainty evaluation about the determination results of dehydroacetic acid in mooncakes by gas chromatography [J]. Food Mach, 2011, 27(4): 84-86.
[16] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification method of the working glass container [S].

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



陈 晨, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: chenc1221@163.com