

分光光度法测定白酒中的氰化物含量 不确定度的评定

刘 杨*, 顾鑫荣, 盛丽霞

(大连市检验检测认证技术服务中心, 大连 116630)

摘要: 目的 评定分光光度法测定白酒中氰化物的不确定度, 分析检测条件的改变对检验过程的可靠性及检验结果的准确度的影响。**方法** 在 GB 5009.36-2016《食品安全国家标准食品中氰化物的测定》分光光度法的基础上, 改为使用 20 mL 比色管定容溶液体积至 12 mL, 并确定检测方法不确定度来源, 计算各不确定度分量及扩展不确定度。**结果** 当白酒样品中氰化物含量为 0.25 mg/L 时, 扩展不确定度为 0.01 mg/L ($P=95\%$, $k=2$), 样品前处理和标准溶液配制对方法不确定度贡献较小, 样品重复测定对方法不确定度贡献最大。**结论** 定容体积的改变和使用 20 mL 的比色管对检测过程干扰较弱, 对检测结果的准确度影响较小, 可以采用提高检测数据稳定性的方法来降低测量不确定度, 提高检测结果准确度。

关键词: 分光光度法; 白酒; 氰化物; 不确定度

Uncertainty evaluation for the determination of cyanide in liquor by spectrophotometry

LIU Yang*, GU Xin-Rong, SHENG Li-Xia

(Dalian Center for Certification and Food and Drug Control, Dalian 116630, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of cyanide in liquor by spectrophotometry, and analyze the impact of changes in detection conditions on the reliability of the inspection process and the accuracy of the inspection results. **Methods** On the basis of the spectrophotometric method according to GB 5009.36-2016 *National food safety standard-Determination of cyanide in food*, the volume of solution with constant volume of 20 mL colorimetric tube was changed to 12 mL, and the sources of uncertainty of the detection method were determined, and the uncertainty components and extended uncertainty were calculated. **Results** When the cyanide content in liquor sample was 0.25 mg/L, the extended uncertainty was 0.01 mg/L ($P=95\%$, $k=2$). The sample pretreatment and standard solution preparation contributed less to the method uncertainty, while the sample repeated determination contributed the most to the method uncertainty. **Conclusion** The change of constant volume and the use of 20 mL colorimetric tube have a weak interference on the detection process and a small impact on the accuracy of the detection results. Therefore, the method of improving the stability of the detection data can be adopted to reduce the measurement uncertainty and improve the accuracy of the detection results.

KEY WORDS: spectrophotometry; liquor; cyanide; uncertainty

*通讯作者: 刘杨, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与食品理化检测技术。E-mail: liuyang1260_cn@sina.com

*Corresponding author: LIU Yang, Master, Engineer, Dalian Center for Certification and Food and Drug Control, No.888A Huanghe Road, Shahekou District, Dalian 116630, China. E-mail:liuyang1260_cn@sina.com

1 引言

我国是酒类产品消费大国,其中白酒在整个酒类消费中占重要份额,据 2018 年天猫酒水线上消费数据统计,白酒占整个酒类消费金额过半,白酒在酿造过程中会产生甲醇、氰化物、生物胺等内生性风险物质^[1-3],因此加强白酒风险物质监管,对保障消费者的健康安全有十分重要的意义。

在白酒所有的内生性风险物质中,氰化物的安全风险较为突出^[4]。2015 年 10 月至 12 月,国家食品药品监督管理总局组织抽检白酒 943 批次样品中涉及安全指标氰化物不合格的有 5 批次,占 0.53%^[5]。白酒中的氰化物主要来源于酿造原料,以纯粮谷物酿制的白酒,氰化物含量较微,但一些中低端白酒,生产商为了追求高酒精产量及节省生产成本,会使用五碳糖含量较高的木薯类作为酿造原料^[6],木薯类含有氰糖苷,该物质在酿造过程中会转化为氢氰酸^[7],如果生产工艺不达标,就会造成酒中氰化物超标^[8]。目前我国对氰化物在白酒中的限量要求按照国标 GB2757-2012《食品安全国家标准蒸馏酒及其配制酒》为不得超过 8 mg/L(以 HCN 计,按 100%酒精度折算)^[9]。

检测机构对于白酒中氰化物的日常检验,主要是依据国家标准 GB 5009.36-2016《食品安全国家标准食品中氰化物的测定》^[10]中的分光光度法进行,分光光度法由于操作简便快捷,定量准确,因此应用广泛^[11-13]。该方法的原理是在中性条件下,酒中的氰化物与氯胺 T 生成氯化氰,氯化氰与异烟酸反应水解生成戊烯二醛,最后与吡啶啉酮生成蓝色络合物。在实际操作中,由于白酒样品中的有机酸和杂酯类物质有时会对溶液 pH 产生影响,调 pH 时加入的酸碱溶液经常大于限量,使最后的定容体积超出 10 mL 而导致实验失败。周虹等^[14]采用溶液调节 pH 后先定容至 10 mL,再加入 2 mL 异烟酸—吡啶啉酮溶液的方法,扩大了酸碱溶液使用限量,提高了实验的成功率。但目前的研究只对该方法可行性进行了初步探讨,对检验过程的可靠性及检验结果的准确度分析还未见报道,该方法是否适用于白酒中氰化物的日常检验还有待确认。

本研究系统的对该方法进行不确定度评定,通过对各不确定度分量的分析计算,确定各不确定度来源对检验结果的影响,以期该方法应用于白酒中的氰化物的日常检验提供理论依据,为分光光度法测定白酒中氰化物标准方法的改进提供合理建议。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UH5300 紫外分光光度计(日本日立公司);ME204E 电子天平 $[d=0.0001\text{ g}]$,瑞士梅特勒-托利多仪器(上海)有限公

司];HWS-12 恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

氯胺 T(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);酚酞(指示剂,天津津北精细化工有限公司);无水乙醇、氢氧化钠、无水磷酸二氢钾、无水硫酸氢二钠、异烟酸、吡啶啉酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水中氰成分分析标准标准物质(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,GBW(E)080115,中国计量科学研究院)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

准确量取 2 mL 水中氰成分分析标准物质,用 2 g/L 氢氧化钠定容至 100 mL,配制成 1 mg/L 的氰离子标准中间液。

分别量取 0、0.6、0.9、1.2、1.8、2.4 mL 氰离子标准中间液于 20 mL 比色管中,加 2 g/L 氢氧化钠定容至 5 mL,配制成标准工作液。

2.2.2 分析步骤

吸取 1.0 mL 白酒试样于 50 mL 烧杯中,加入 5 mL 2 g/L 氢氧化钠溶液,放置 10 min,然后放于 120 $^{\circ}\text{C}$ 电加热板上加热至溶液剩余约 1 mL,取下放至室温,用 2 g/L 氢氧化钠溶液转移至 20 mL 具塞比色管中,最后加 2 g/L 氢氧化钠至 5 mL。

于试样及标准工作液中分别加入 2 滴酚酞指示剂,然后加入乙酸溶液调至红色褪去,再用 2 g/L 氢氧化钠溶液调至近红色,然后加 2 mL 磷酸盐缓冲溶液,再加入 0.2 mL 氯胺 T 溶液,摇匀放置 3 min,加水稀释至 10 mL,再加入 2 mL 异烟酸—吡啶啉酮溶液,混合均匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中放置 40 min,取出用 1 cm 比色杯以空白管调节零点,于波长 638 nm 处测吸光度。

2.2.3 数学模型及不确定度来源分析

试样中氰化物(以 CN^- 计)含量的计算公式为:

$$X = \frac{\rho}{V}$$

式中:

X —试样中氰化物含量(以 CN^- 计),mg/L;

ρ —由标准曲线算得样液中氰化物含量,mg/L;

V —试样体积,mL。

2.2.4 不确定度分量来源

根据分析步骤以及计算公式,检测结果的不确定度主要来源于样品前处理,标准溶液的配制,标准曲线的拟合,样品检测的重复性,回收率等方面,见图 1 所示。

3 结果与分析

3.1 样品前处理所引入的不确定度

在白酒样品的前处理中,需用到移液管移取,比色管定容,其中移取过程 1 mL 移液管允差为 $\pm 0.005\text{ mL}$,按均匀分布,其产生的不确定度为:

$$u(V_{1-1}) = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 0.00289;$$

相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_{1-1}) = \frac{u(V_{1-1})}{V_{1-1}} = \frac{0.00289}{1.0} = 0.00289。$$

已知水的膨胀系数 $\alpha = 2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 移液管在 $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ 校准, 测试温在 $(20 \pm 4) \text{ } ^\circ\text{C}$ 范围内波动, 按均匀分布, 温度变化所引起的移液管液体体积变化所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_{1-2}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 1.0 \times 4}{\sqrt{3}} = 0.00049。$$

移取过程的合成不确定度为:

$$u_{rel}(V_1) = \sqrt{u_{rel}(V_{1-1})^2 + u_{rel}(V_{1-2})^2} = 0.00293。$$

在定容过程中, 20 mL 比色管允差为 $\pm 0.20 \text{ mL}$, 按均匀分布, 其产生的不确定度为:

$$u(V_{2-1}) = \frac{0.20}{\sqrt{3}} = 0.115;$$

相对标准不确定度为

$$u_{rel}(V_{2-1}) = \frac{u(V_{2-1})}{V_{2-1}} = \frac{0.115}{20.0} = 0.00575。$$

温度变化所引起的比色管液体体积变化所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_{2-2}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 12.0 \times 4}{\sqrt{3}} = 0.00588。$$

定容过程的合成不确定度为:

$$u_{rel}(V_2) = \sqrt{u_{rel}(V_{2-1})^2 + u_{rel}(V_{2-2})^2} = 0.00822。$$

所以样品前处理所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{rel}(V_1)^2 + u_{rel}(V_2)^2} = 0.00873。$$

3.2 标准溶液配制所引入的不确定度

氰化物标准物质的相对扩展不确定度为 $1\% (k=2)$, 则其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(c_1) = \frac{0.01}{2} = 0.005。$$

标准溶液的配制需用到 2 mL 移液管、 100 mL 容量瓶和 20 mL 比色管, 允差分别为 $\pm 0.01 \text{ mL}$ 、 $\pm 0.1 \text{ mL}$ 和 $\pm 0.20 \text{ mL}$, 根据上文中 1 mL 移液管不确定度的计算步骤可算出,

2 mL 移液管的相对标准不确定度 $u_{rel}(c_2) = 0.00289$, 100 mL 容量瓶的相对标准不确定度为 $u_{rel}(c_3) = 0.00058$, 20 mL 比色管的相对标准不确定度为 $u_{rel}(c_4) = 0.00575$, 则标准溶液配制所引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(c) = \sqrt{u_{rel}(c_1)^2 + u_{rel}(c_2)^2 + u_{rel}(c_3)^2 + u_{rel}(c_4)^2} = 0.00817。$$

3.3 标准曲线拟合所引入的不确定度

本实验以氰离子含量 0 、 0.5 、 0.75 、 1.0 、 1.5 、 2.0 mg/L 配制标准曲线, 并对吸光度-氰离子含量曲线进行拟合, 得到回归方程为 $Y = 3.9904X + 0.001$, $r^2 = 0.9994$ 。

根据实验结果, 可得出氰化物标准曲线的标准偏差为:

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{0.001015}{4}} = 0.0159$$

式中:

S_R —氰化物标准曲线标准差;

y_i —由标准曲线算得每个测量点氰化物含量, mg/L ;

y —每个测量点氰化物含量, mg/L ;

n —测量次数。

氰化物标准曲线拟合所引入的标准不确定度为^[15]:

$$u(Q) = \frac{S_R}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(c - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{0.0159}{3.9904} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{6} + \frac{0.5013}{1.68}} = 0.00317$$

式中:

S_R —氰化物标准曲线标准差;

a —标准曲线斜率;

n —标准曲线测定次数;

p —样品测定次数;

y_i —每个测量点氰化物含量, mg/L ;

\bar{y} —标准曲线氰化物含量平均值, mg/L ;

c —由标准曲线算得样品中氰化物含量, mg/L 。

氰化物标准曲线拟合所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(Q) = \frac{u(Q)}{c} = \frac{0.00317}{0.25} = 0.0127。$$

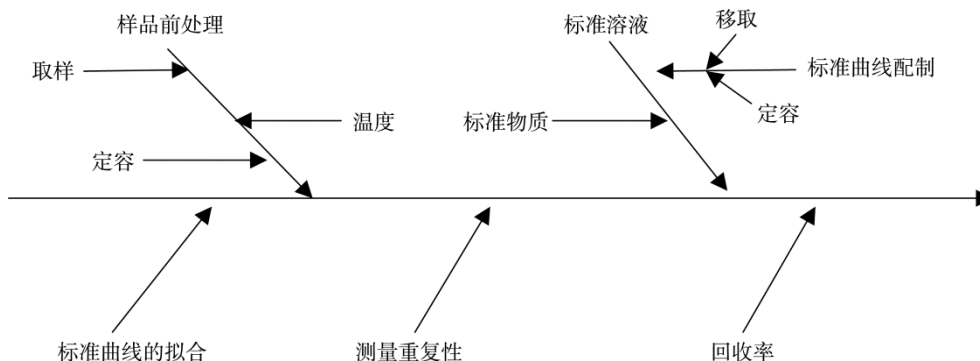


图 1 氰化物测定不确定度来源图示

Fig.1 A graphical representation of the source of uncertainty in cyanide determination

3.4 样品重复测定所引入的不确定度

根据 2.2.2 分析步骤测定同一份白酒样品中的氰化物含量, 在相同条件下重复测定 6 次, 所得结果平均值 c 为 0.25 mg/L, 标准偏差 $S_{(C)}$ 为 0.0118。

由样品重复测定所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\text{rep}) = \frac{S_{(c)}}{c \times \sqrt{6}} = \frac{0.0118}{0.25 \times \sqrt{6}} = 0.0193。$$

3.5 回收率所引入的不确定度

在白酒样品中分别加入 0.2、0.4、0.6 mg/L 氰化物标准物质, 测定白酒中氰化物含量, 所得数据见表 1。

由回收率所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(R) = \frac{S_{(R)}}{\bar{R} \times \sqrt{6}} = \frac{0.0296}{0.975 \times \sqrt{6}} = 0.0124。$$

对回收率进行 t 显著性检验, 在 95% 置信区间内, $n=6$ 时的 t 分布临界值 $t_{0.95(n-1)}=2.57$, 当检验值 $t = \frac{|1-\bar{R}|}{u_{\text{rel}}(R)} \geq 2.57$ 时, 则实际回收率与 1 之间有显著性差异, 通过计算 $t=2.02 < 2.57$, 无需采用回收率修正结果。

3.6 合成不确定度

通过以上不确定度评定过程, 各不确定度分量及数值见表 2。

由各不确定度分量计算可得氰化物测定的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}} = \sqrt{u_{\text{rel}}(V)^2 + u_{\text{rel}}(c)^2 + u_{\text{rel}}(Q)^2 + u_{\text{rel}}(\text{rep})^2 + u_{\text{rel}}(R)^2} \\ = \sqrt{0.00873^2 + 0.00837^2 + 0.0127^2 + 0.0193^2 + 0.0124^2} \\ = 0.0289。$$

标准不确定度为 $u = u_{\text{rel}} \times c = 0.0283 \times 0.25 = 0.00723$ 。

3.7 不确定度结果报告

取包含因子 $k=2$, 则扩展不确定度为 $U = ku = 2 \times 0.00723 = 0.014 \text{ mg/L} \approx 0.01 \text{ mg/L}$, 根据 JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示^[16], 白酒样品中氰化物含量为 $X = (0.25 \pm 0.01) \text{ mg/L}$, $k=2$ 。

4 结 论

检测方法的结果是否可靠要通过评定不确定度来反映^[17], 本实验系统评定了分光光度法检测白酒中氰化物的不确定度, 检测结果的不确定度为 0.01 mg/L, 样品的前处理和标准溶液的配制对本方法的不确定度贡献较小, 本实验所采用的检测方法与标准方法相比, 样品的定容体积由 10 mL 增至 12 mL, 定容所使用的比色管由 10 mL 改为 20 mL, 会对这两个不确定度来源产生影响, 从不确定度的评定结果来看, 定容体积的改变和使用 20 mL 的比色管对检测过程干扰较弱, 对检测结果的准确度影响较小。

样品的重复测定对方法的不确定度贡献最大, 说明检测结果的准确度主要受检测数据的稳定性的影响, 建议以后在实际样品检测中, 可采用增加测定重复次数, 使用质控样品, 提高仪器稳定性等方法, 来降低测量不确定度, 提高实验结果准确度。

表 1 白酒中氰化物加标回收测定结果
Table 1 Results of recovery experiment of determination of cyanide

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------|------|------|-------|------|------|------|
| 加标浓度/(mg/L) | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.6 |
| 本底浓度/(mg/L) | | | 0.25 | | | |
| 测定结果/(mg/L) | 0.43 | 0.42 | 0.66 | 0.63 | 0.83 | 0.85 |
| 回收率 $R/\%$ | 95.6 | 93.3 | 101.5 | 96.9 | 97.6 | 100 |
| 回收率平均值 $\bar{R}/\%$ | | | 97.5 | | | |
| 回收率标准偏差 $S_{(R)}/\%$ | | | 2.96 | | | |

表 2 白酒中氰化物的测定不确定度来源及数值
Table 2 Source and value of uncertainty for determination of cyanide in liquor

| 不确定度来源 | 样品前处理 | 标准溶液配制 | 标准曲线拟合 | 样品重复测定 | 回收率 |
|--------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| 不确定度分量 | $u_{\text{rel}}(V)$ | $u_{\text{rel}}(c)$ | $u_{\text{rel}}(Q)$ | $u_{\text{rel}}(\text{rep})$ | $u_{\text{rel}}(R)$ |
| 数值 | 0.00873 | 0.00817 | 0.0127 | 0.0193 | 0.0124 |

参考文献

- [1] 张秋, 范光森, 李秀婷. 我国白酒质量安全现状浅析[J]. 中国酿造, 2016, 35(11): 20–25.
Zhang Q, Fan GS, Li XT. Brief analysis on the status of Baijiu quality and safety in China [J]. China Brew, 2016, 35(11): 20–25.
- [2] 艾欢秀. 白酒中有害物质的探讨[J]. 酿酒, 2018, 45(1): 85–88.
Ai HX. Discussion on harmful substances in liquor [J]. Liquor Mak, 2018, 45(1): 85–88.
- [3] 苟静瑜, 贾智勇, 闫宗科, 等. 降低白酒中高级醇含量的研究进展[J]. 酿酒, 2016, 43(4): 25–29.
Gou JY, Jia ZY, Yan ZK, *et al.* Research progress in decreasing the contents of higher alcohols in baijiu (liquor) [J]. Liquor Mak, 2016, (4): 25–29.
- [4] 郑淼, 岳红卫, 钟其顶. 白酒质量安全风险及其控制[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(2): 18–23.
Zheng M, Yue HW, Zhong QD. Safety risk and its control of Chinese white spirits [J]. J Food Sci Technol, 2016, 34(2): 18–23.
- [5] 王涛, 张文学, 邹强, 等. 我国蒸馏白酒中内生性风险物质现状浅析[J]. 中国酿造, 2019, 38(5): 13–17.
Wang T, Zhang WX, Zou Q, *et al.* Brief analysis of endogenous risk substances in distilled liqueur in China [J]. China Brew, 2019, 38(5): 13–17.
- [6] 黄发新, 徐中文, 黄勇然, 等. 木薯酒的研究[J]. 中国酿造, 1996, 15(1): 15–19.
Huang FX, Xue ZW, Huang YR, *et al.* Research of cassava [J]. China Brew, 1996, 15(1): 15–19.
- [7] 刘诗宇, 吴幼茹, 付悦, 等. 顶空气相色谱法筛选低含量氰化物酿酒原料的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(10): 163–167.
Liu SY, Wu YR, Fu Y, *et al.* Screening of liquor-making raw materials with low cyanide content by headspace gas chromatography [J]. China Brew, 2016, 35(10): 163–167.
- [8] 韩小龙. 提高木薯原料生产酒精出酒率的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2007.
Han XL. Studies on improving alcohol yield utilizing cassava as raw material [D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2007.
- [9] GB 2757-2012 食品安全国家标准蒸馏酒及其配制酒[S].
GB 2757-2012 Food safety national standard-Distilled wine and its preparation [S].
- [10] GB 5009.36-2016 食品安全国家标准食品中氰化物的测定[S].
GB 5009.36-2016 Food safety national standard-Determination of cyanide in food [S].
- [11] 刘杨, 王超, 刘倩倩, 等. 检测食用酒精氰化物含量的不确定度评定[J]. 酿酒科技, 2019, 5(299): 121–124.
Liu Y, Wang C, Liu QQ, *et al.* Evaluation of the uncertainties in determination of cyanide content in edible alcohol [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2019, 5(299): 121–124.
- [12] 杨周彦, 吴燕. 分光光度法测定水和废水中总氰化物含量不确定度评定[J]. 石油化工安全环保技术, 2017, 33(6): 57–62.
Yang ZY, Wu Y. Assessment of uncertainty in determination of total cyanide content in water and wastewater by spectrophotometry [J]. Petrochem Saf Environ Protect Technol, 2017, 33(6): 57–62.
- [13] 张文德, 张光仲, 郭忠, 等. 酒中微量氰化物的测定方法研究[J]. 中国食品卫生, 2004, 16(3): 232–235.
Zhang WD, Zhang GZ, Guo Z, *et al.* Study on the determination of cyanide in wine [J]. Chin J Food Hyg, 2004, 16(3): 232–235.
- [14] 周虹, 周忠彬. 酒中氰化物测定方法探讨[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(6): 510.
Zhong H, Zhou ZB. Discussion on the determination method of cyanide in wine [J]. China Public Health, 2001, 17(6): 510.
- [15] CNAS-GL 006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 006 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [16] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.12012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [17] 尚德军, 王军. 测量不确定度的研究和应用进展[J]. 理化检验(化学分册), 2004, (10): 623–627.
Shang DJ, Wang J. Research and application progress of measurement uncertainty [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2004, (10): 623–627.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘 杨, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与食品理化检测技术。
E-mail: liuyang1260_cn@sina.com