

高效液相色谱法测定凉皮中米酵菌酸含量的不确定度评定

蔡松铃 苏世豪

上海杉达学院

DOI:10.12238/bmtr.v7i3.14427

[摘要] 目的: 建立一种高效液相色谱法测定凉皮中米酵菌酸的不确定度的评定方法。方法: 按照食品安全国家标准GB 5009.189-2023进行检测,依据国家计量技术规范 JJF1059.1-2012 分析凉皮中米酵菌酸的含量,分析测量过程中的不确定度因素,合成标准不确定度并计算扩展不确定度。结果: 按置信区间为95%,加入已知浓度标准溶液的凉皮样品测出米酵菌酸含量为 $(15.392 \pm 2.453) \mu\text{g/kg}$, $k=2$ 。结论: 米酵菌酸标准曲线配制过程、样品前处理称重以及高效液相色谱仪仪器这三者为影响凉皮中米酵菌酸含量测定结果的主要因素,可在实验过程中加以关注和控制,以提高检验结果的准确性。

[关键词] 高效液相色谱; 凉皮; 米酵菌酸; 不确定度; 评定

中图分类号: S146+.2 文献标识码: A

Evaluation of uncertainty in determination of bongkretic acid in cold noodles by high performance liquid chromatography

Songling Cai Shihao Su

Food Quality and Safety Department, College of Management, Shanghai Sanda University

[Abstract] Objective: To establish an evaluation method of uncertainty for the determination of oryzic acid in Liangpi by HPLC. Methods: The test was carried out according to the national food safety standard GB 5009.189-2023, and the content of zymosic acid in Liangpi was analyzed according to the national metrological technical specification JJF1059.1-2012, the uncertainty factors in the measurement process were analyzed, the standard uncertainty was synthesized and the expanded uncertainty was calculated. Results: According to the confidence interval of 95%, the content of oryzic acid in Liangpi sample added with standard solution of known concentration was $(15.392 \pm 2.453) \mu\text{g/kg}$, $k=2$. Conclusion: The preparation process of the standard curve of rice yeast acid, the sample pretreatment and weighing, and the high performance liquid chromatograph are the main factors affecting the determination results of rice yeast acid in Liangpi, which can be paid attention to and controlled during the experiment to improve the accuracy of the test results.

[Key words] high performance liquid chromatography; cold noodle; bongkretic acid; uncertainty; evaluation

米酵菌酸是椰毒假单胞菌繁殖过程中产生的一种具有较强生物活性的细菌毒素,误食该毒素污染的食物可引起急性米酵菌酸中毒,影响细胞正常代谢,损害肝脏、肾脏等器官,严重时可导致死亡^[1,2]。米面凉皮等自制发酵食品易受椰毒假单胞菌污染,目前,我国针对食品中米酵菌酸含量检测的依据是GB 5009.189-2023《食品安全国家标准食品中米酵菌酸的测定》^[3]。因此,本文参照该标准中的第一法建立高效液相色谱法测定凉皮中米酵菌酸含量的不确定度分析方法,从而保障检测结果的准确性和可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂。固相萃取柱: PolyplusTMMAX-2 60mg/3ml (美正检测); 米酵菌酸标准溶液 $100 \mu\text{g/ml}$ (BePure北京曼哈格); 氨水分析纯(上海国药试剂); 甲醇色谱纯(上海国药试剂)。

1.2 仪器与设备。agilent 1260高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); XUBA3超声波水浴振荡器(英国Grant仪器); RE5205 旋转蒸发仪(上海亚荣仪器); HNDK200-2氮吹仪(上海汉诺仪器); VisiprepSPE-24固相萃取装置(美国Supelco色谱科); MS204S分析天平(0.0001g) (梅特勒托利多METTLER TOLEDO)。

1.3 实验方法。

1.3.1 标准溶液配制。直接选用购买的米酵菌酸(铵盐)标准品作为标准储备液,浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$,然后用移液枪吸取一定体积的标准储备液,再用甲醇作为溶剂定容至10ml容量瓶,配成米酵菌酸质量浓度分别为0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作溶液,用于制备标准曲线。

1.3.2 样品处理。选取来自不同市售小吃摊的凉皮样品6份,

每份样品做双平行, 并做样品空白, 前处理方法按照国家标准 GB5009.189-2023 方法中的 5.1.1 固相萃取法进行试样制备^[3], 最后用 0.45 μm 微孔有机滤膜过滤后待上机检测。

1.3.3 高效液相色谱条件。采用 C18 柱 (填料粒径 5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流柱温: 30 ℃; 流动相: 甲醇+甲酸水溶液 (pH2.5)=80+20 (V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 267 nm; 进样量: 20 μL; DAD 检测器。

1.3.4 数学模型。根据米酵菌酸测定结果的计算公式, 确定评定凉皮中米酵菌酸不确定度的数学模型为:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_2 \times 1000}{m \times V_3}$$

式中: X—米酵菌酸在凉皮试样中的含量 (μg/kg); C—由标准曲线得到的米酵菌酸质量浓度 (μg/mL); V₁—凉皮试样溶液提取液的体积 (mL); V₂—凉皮样品经净化后定容体积 (mL); m—凉皮试样质量 (g); V₃—用于净化量取的试样溶液体积 (mL); 1000—单位换算系数。

2 不确定度来源与分量评定

根据 1.3.4 数学模型、检测过程分析, 不确定度来源有: 凉皮样品称重、凉皮样品定容、凉皮试样重复测定、米酵菌酸标准品纯度、米酵菌酸标准品拟合的标准曲线、米酵菌酸标准品溶液配制过程中所使用的器具, 加入标准溶液后的回收率, 测量米酵菌酸含量的液相色谱仪, 共 7 个因素, 不确定度分量评定具体如下。

2.1 样品称重引入的不确定度。在检测实验室的实际测定过程中, 样品称重是前处理环节的第一步, 所用到的电子天平会对实验数据准确性产生一定影响。用 METTLER TOLEDO MS204S 电子天平称量样品, 根据检定校准证书 (证书编号: J23449S00795), 扩展不确定度为 $U_{天平}=0.2\text{mg}$, $k=2$, 称取 6 份凉皮样品的平均质量为 $m=20.0434\text{g}$, 则相对标准不确定度为:

$$u_{rel1} = \frac{U_{天平}}{k \times m} = \frac{0.0002}{2 \times 20.0434} = 5.0 \times 10^{-6}$$

2.2 样品溶液定容引入的不确定度。根据《国家计量检定规程 常用玻璃量器》(JJG 196—2006)^[4]和《国家计量检定规程 移液器》(JJG 646—2006)^[5]的规定, 定容体积引入的不确定度如下:

2.2.1 温度引入的标准不确定度 $u_1(V)$ 。实验过程操作温度为 25 ℃, 而国家计量技术规程 JJG 196-2006^[4]要求为 20 ℃, 当实验室温度在 (20 ± 5) ℃ 时, 水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 其按均匀分布 ($k=3$), 则温度引入的标准不确定度为:

$$u_1(V) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 100}{\sqrt{3}} = 0.0606$$

2.2.2 容量瓶引入的不确定度 $u_{rel}(V_1)$ 。当样品提取液定容至 100 mL 容量瓶时, A 级 100 mL 容量瓶的容量允差: ±0.10 mL, 按均匀分布 ($k=3$), 则校准容量瓶体积引入的标准不确定度:

$$u_2(V) = \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.0577$$

溶液定容体积过程中产生的标准不确定度

$$u(V) = \sqrt{u_1(V)^2 + u_2(V)^2} = 0.0837$$

相对不确定度为 $u_{rel}(V_1) = u(V)/100 = 0.000837$ 。

2.2.3 移液器引入的不确定度 $u_{rel}(V_2)$ 。用 1000 μL 的移液器吸取 500 μL 甲醇溶液溶解凉皮样品净化后的试样, 根据校准结果可知, 1000 μL 移液器扩展不确定度为 $U = 1.5 (k=2)$, 允差为 ±1.0%, 故使用 1000 μL 移液器所引入的标准不确定度为:

$$u_3(V) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.0058$$

同理, 吸取 500 μL 甲醇溶液溶解过程中产生的标准不确定度 $u_{rel}(V_2) = 0.0116$

综上, 定容体积引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel2} = \sqrt{u_{rel}(V_1)^2 + u_{rel}(V_2)^2} = \sqrt{0.000837^2 + 0.0116^2} = 0.0116$$

2.3 标准溶液配制过程中引入的不确定度。

2.3.1 标准品校准。米酵菌酸标准品选取浓度为 100.0 μg/mL 的甲醇中米酵菌酸 (铵盐), 根据米酵菌酸标准品证书 (产品编号: BePure-22462XM-1mL; 批号: F0060810) 可知, 米酵菌酸标准品的相对扩展不确定度为 ±3% ($k=2$), 故米酵菌酸标准品引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel3} = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173$$

2.3.2 配制标准溶液。本次实验配制标准工作液用到米酵菌酸标准品浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别用到 100 μL 和 1000 μL 两种规格移液器以及规格为 10 mL 的容量瓶, 依次配成浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的米酵菌酸标准工作溶液, 假设玻璃量器引入的不确定度服从均匀分布, k 取 $\sqrt{3}$, 那么该容量允差引入的标准不确定度以 20 ℃ 时的容量允差除以计算, 则标准工作溶液配制过程中引入的相对标准不确定度为:

$$\begin{aligned} u_{rel4}(\text{曲线}) &= \{u_{rel}^2(V_{0.1}) + u_{rel}^2(V_{0.5}) + u_{rel}^2(V_1) + u_{rel}^2(V_5) + u_{rel}^2(V_{10}) + u_{rel}^2(V_{20}) \\ &\quad + u_{rel}^2(V_{10} \text{ 容量瓶}) \times 6\}^{\frac{1}{2}} \\ &= [(0.0462)^2 + (0.0173)^2 + (0.0115)^2 + (0.0058)^2 + (0.0058)^2 \\ &\quad + (0.0058)^2 + (0.0115)^2 \times 6]^{\frac{1}{2}} = 0.0588 \end{aligned}$$

2.4 标准曲线拟合引入的不确定度。根据 1.3.1 实验方法中的标准工作曲线, 6 个不同浓度的米酵菌酸含量点所测得的峰面积对数 Y_i 依次为 0.031、0.213、0.467、2.88、5.78、11.57, 经过标准曲线拟合, 米酵菌酸线性方程为 $y = 0.5813x - 0.048$, $R^2 = 0.9999$, 斜率 $a = 0.5813$, 截距 $b = -0.048$, 标准曲线变动性的米酵菌酸标准偏差 S 计算如下:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - (aC_i + b)]^2}{n - 2}} = 0.04164$$

其中: 每个浓度点上机平行测试 2 次, 标准溶液测定次数共 12 次, 即 $n=12$; Y_i 为测定的色谱峰面积对数; C_i 为第 i 次测量时米酵菌酸标准溶液的浓度。

因市售的凉皮样品中的米酵菌酸含量均未达到仪器检测限, 未检出值, 所以直接通过计算加入 50 μg/kg 米酵菌酸内标物后的值来得出不确定度值。本实验对加入米酵菌酸标准溶

液后的样品进行7次重复测定,加标凉皮样品测出的峰面积对照米酵菌酸标准曲线得出浓度结果分别为: 1.7046, $\mu\text{g/mL}$ 1.6960 $\mu\text{g/mL}$, 1.6761 $\mu\text{g/mL}$, 1.6983 $\mu\text{g/mL}$, 1.6902 $\mu\text{g/mL}$, 1.6991 $\mu\text{g/mL}$, 1.6969 $\mu\text{g/mL}$, 平均质量浓度为 $C_{\#}=1.6945 \mu\text{g/mL}$ 。因此,由标准曲线拟合的不确定度计算公式为

$$U_{(C)} = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{n} + \frac{(C_{\#} - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^N (C_i - \bar{C})^2}} = 0.03859$$

其中: M为凉皮试样平行测定次数, $M=7$; $\bar{C}$ 为米酵菌酸标准系列溶液的平均质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), $\bar{C}=6.10 \mu\text{g/mL}$, 计算得出标准曲线引入的标准不确定度 $U(c)=0.03859$, 则相对不确定度 $u_{rel5}=U(c)/C_{\#}=0.0228$ 。

2.5 高效液相色谱仪引入的不确定度。检测凉皮中米酵菌酸含量所选取的高效液相色谱仪检测器为DAD二极管阵列检测器(校准证书编号: 419020483), 检测器校准证书给出的扩展不确定度为5.2%, $k=2$, 根据国家计量技术规范——测量不确定度评定与表示^[6], 计算公式为:

$$u_{rel6} = \frac{0.052}{\sqrt{3}} = 0.03$$

2.6 试样重复测定引入的不确定度。本次实验对凉皮样品中米酵菌酸含量的检测, 结果均未达到国标规定的检测限, 故在样品中加入浓度为50 $\mu\text{g/kg}$ 米酵菌酸标准品作为对照样品, 根据JJF1059.1-2012国家计量技术规范^[6], 实验重复性引入的不确定度为A类标准不确定度, 本次共测量7个平行样品, 即 $n=7$, 结果分别为1.7046 $\mu\text{g/mL}$, 1.6960 $\mu\text{g/mL}$, 1.6761 $\mu\text{g/mL}$, 1.6983 $\mu\text{g/mL}$, 1.6902 $\mu\text{g/mL}$, 1.6991 $\mu\text{g/mL}$, 1.6969 $\mu\text{g/mL}$, 则平均值 $\bar{x}=1.6945 \mu\text{g/mL}$, 利用贝塞尔公式计算重复测定样品的标准偏差为:

$$S(X) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [x_i - \bar{x}]^2}{n-1}} = 0.00915$$

则测量重复性引入的相对不确定度为

$$u_{rel7}(\text{重复}) = \frac{S(X)}{\bar{x} \times \sqrt{7}} = 0.00223$$

2.7 回收率实验引入的不确定度。称取3份米酵菌酸的凉皮样品, 加入米酵菌酸标准溶液, 使内标浓度依次为15 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 500 $\mu\text{g/kg}$, 每份样品平行测定7次。通过计算, 得出三个凉皮加标试样的平均回收率依次为102.61%、93.47%、82.45%, 标准偏差S分别为1.83%、0.71%、1.21%, 则回收率引入的标准不确定度

$$u_{rec(15)} = S_1/\sqrt{n} = 0.00692; \quad u_{rec(50)} = S_2/\sqrt{n} = 0.00268;$$

$$u_{rec(500)} = S_3/\sqrt{n} = 0.00457;$$

回收率引入的相对标准不确定度为

$$u_{rel8} = \sqrt{u_{rec(15)}^2 + u_{rec(50)}^2 + u_{rec(500)}^2} = 0.00871$$

2.8 合成标准不确定度。综上, 实验过程中, 影响检验结果的各个因素引入的相对不确定度为:

$$U_{rel} = \sqrt{U_{rel1}^2 + U_{rel2}^2 + U_{rel3}^2 + U_{rel4}^2 + U_{rel5}^2 + U_{rel6}^2 + U_{rel7}^2 + U_{rel8}^2} = 0.0797$$

根据1.3.4数学模型、添加15 $\mu\text{g/kg}$ 米酵菌酸凉皮试样的测试结果, 样品进样液中米酵菌酸峰面积对应的浓度 $\bar{C}=0.6134$, 凉皮样品的定容体积 $V_1=100\text{mL}$, 凉皮样品经净化后定容体积 $V_2=0.5\text{mL}$; 用于净化量取的试样溶液体积 $V_3=50\text{mL}$; 凉皮试样的称样量 $\bar{m}=20.0496$, 则米酵菌酸的平均含量为 $X=15.392 \mu\text{g/kg}$ 。

合成标准不确定度 $U_k=U_{rel}X=0.0797 \times 15.392=1.228 \mu\text{g/kg}$ 。

2.9 结果。相对扩展不确定度为 $U=U_{k2}=1.228 \times 2=2.453 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$, $P=95\%$)。所以不确定度评估报告的表达方式为: 用高效液相色谱法检测凉皮样品中米酵菌酸的含量: 当 $k=2$ 时, $X \pm U=(15.392 \pm 2.453) \mu\text{g/kg}$ 。

3 结果与讨论

由不确定度分量评定的数据结果得出, 影响高效液相色谱法测定凉皮中米酵菌酸含量的不确定度顺序依次为: u_{rel4} 配制标准溶液过程 $> u_{rel1}$ 凉皮样品称重 $> u_{rel6}$ 液相色谱仪校准 $> u_{rel5}$ 米酵菌酸标准溶液建立的标准曲线拟合 $> u_{rel3}$ 标准溶液校准 $> u_{rel2}$ 样品定容 $> u_{rel8}$ 回收率 $> u_{rel7}$ 重复性测定, 因此, 为了降低检测米酵菌酸含量过程的不确定度, 应该从以下方面考虑: (1) 配制米酵菌酸标准工作液过程中, 对于所使用的玻璃器具带来的不确定度, 要选用高级别的容量瓶和校准过后的移液器, 并且注意设定合适的浓度点, 从而提高检测准确性。(2) 凉皮样品搅匀后比较湿润, 称重过程容易出现样液挂壁, 不均匀等现象, 实验人员应该注意凉皮样品前处理过程操作, 从而提高检测准确性。(3) 实验室内的液相色谱仪应该做好仪器保养、定时检定校准, 从而降低仪器引入的不确定度。

【参考文献】

[1] 陈荣桥, 陈汉金, 胡均鹏. 椰毒假单胞菌酵米面亚种在湿米粉及其原料中的生长产毒规律及风险分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(05): 320-325.

[2] SHI R J, LONG C Y, DAI Y D, et al. Bongkrekic acid poisoning: severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food[J]. Legal Medicine, 2019, 41: 101622.

[3] 中华人民共和国卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 5009.189-2023 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.

[4] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.

[5] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 646-2006 国家计量检定规程 移液器[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.

[6] 国家技术监督局. JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 2012.

作者简介:

蔡松铃(1991--), 女, 汉族, 上海市人, 硕士, 实验师, 研究方向: 食品加工与安全检测。