

高效液相色谱法测定辣椒粉中罗丹明B的测量不确定度评估

牛 华, 牛之瑞*, 冯 雷, 鲁燕骅, 马雪涛, 谭建林, 张学忠, 俸金梅
(云南省产品质量监督检验研究院, 云南 昆明 650223)

摘 要: 采用高效液相色谱法对辣椒粉中的罗丹明B残留量进行不确定度评定, 评估方法的偏倚和精密度, 并对不确定度分量的分析计算, 得出合成不确定度和扩展不确定度。评估结果表明, 样品制备过程中凝胶渗透色谱净化过程回收率的不确定度影响最大, 所以控制凝胶渗透色谱净化过程对回收率的稳定性非常关键。该评估方法实用性强, 模型简单、易懂, 具有较强的参考价值。

关键词: 罗丹明B; 不确定度; 辣椒粉

Evaluation of Uncertainty in Rhodamine B Determination in Chili Powder by HPLC

NIU Hua, NIU Zhi-rui*, FENG Lei, LU Yan-hua, MA Xue-tao, TAN Jian-lin, ZHANG Xue-zhong, FENG Jin-mei
(Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming 650223, China)

Abstract: An uncertainty evaluation model was established for evaluating the determination results of rhodamine B in chili powder by high performance liquid chromatography (HPLC). In this paper, the key factors affecting the measurement results during the analysis process were discussed. Meanwhile, the combined and expanded uncertainties were evaluated. During sample preparation, the recovery of rhodamine B at the purification step by gel permeation chromatography (GPC) made the most important contribution to the overall uncertainty. Therefore, the stability control of GPC during the purification is the key point. The uncertainty evaluation model is practical, simple and easy to understand and valuable as a reference.

Key words: rhodamine B; uncertainty; chili powder

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)08-0165-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201408033

罗丹明B又称玫瑰红B, 或碱性玫瑰精, 俗称花粉红, 以氧蒽为母体, 具有特殊结构及荧光特性。经动物试验发现, 其具有高毒、高残留和致癌、致畸、致突变等特点, 欧美、日本等国家地区已明令禁止该类物质用于食品加工过程中, 2008年我国卫生部将罗丹明B列入《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》明令禁止在食品中添加^[1]。

一切测量结果都不可避免地具有不确定度。测量不确定度是对测量结果的正确性或准确度的“可疑程度”的定量表征, 是说明测量质量的极其重要的指标。我国已经出台文件对校准实验室测量不确定度的评估做出了要求, 但目前许多实验室仍未在检测报告中提供测量结果的不确定度^[2]。

我国现行的检测食品中罗丹明B检测标准只有SN/T

2430—2010《进出口食品中罗丹明B的检测方法》, 采用该方法对辣椒粉中的罗丹明B进行测定, 并评估不确定度, 以期找出影响检测结果的因素, 为实验室类似测量不确定度评定工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣椒粉 市售; 罗丹明B标准品(批号: 212041286, 纯度为97%) 美国ACCU Stand公司; 乙腈、甲醇色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UFLC-XR高效液相色谱(配荧光检测器)、

收稿日期: 2013-08-22

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013QK078)

作者简介: 牛华(1960—), 男, 教授级高级工程师, 博士, 研究方向为实验室管理。E-mail: bull.nzr@163.com

*通信作者: 牛之瑞(1982—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: bullnzr@163.com

LabSlution工作站 日本Shimadzu公司；凝胶渗透色谱自动净化仪 (gel permeation chromatography, GPC) 德国LC-Teach公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

准确称取适量罗丹明B标准品0.001 0 g, 用甲醇配制成100 μg/mL的标准储备液。此溶液在0~4 °C避光保存。以甲醇配制成相当于100 g/L的标准中间液, 再以空白基质溶液稀释成0.5、2.0、4.0 μg/L, 供高效液相色谱测定。

1.3.2 样品的制备^[3]

称取2 g (精确到0.000 1 g) 辣椒粉样品于25 mL容量瓶中, 准确加入20 mL 乙酸乙酯-环己烷溶液(1:1), 于旋涡混合器上混合提取2 min, 再超声提取15 min后, 定容至25 mL, 取上清液过0.22 μm微孔滤膜后做待净化液。

取出10 mL待净化液于凝胶渗透色谱进样瓶, 用于凝胶渗透色谱净化 (凝胶渗透色谱实际进样量为5 mL), 收集洗脱液 (相当于定容至2 mL后, 取出1.5 mL), 氮吹至近干, 残渣用1.0 mL甲醇溶解后, 过0.22 μm微孔滤膜, 供高效液相色谱测定。

1.3.3 色谱条件

色谱柱为Alltima ODS (150 mm×3.0 mm, 4.6 μm), 柱温40 °C; 进样量10 μL; 流动相: 溶剂A为水, 溶剂B为乙腈; 流量1.0 mL/min; 激发波长550 nm, 发射波长580 nm; 梯度洗脱条件见表1。

表1 色谱梯度洗脱条件
Table 1 Gradient chromatographic conditions

时间/min	1.0	5.0	9.0	9.5
乙腈体积分数/%	70	95	95	70

1.4 数学模型的建立与结果计算

用外标法计算辣椒粉中罗丹明B的含量, 其数学模型:

$$X = \frac{(C - C_0) \times V}{m \times 1\,000} \quad (1)$$

式中: X 为辣椒粉样品中罗丹明B的含量/(μg/L); C 为由标准曲线得到的样液中罗丹明B的质量浓度/

(μg/L); C_0 为由标准曲线得到的空白实验中罗丹明B的质量浓度/(μg/L); V 为辣椒粉样品的定容体积/mL; m 为最终样液所代表的试样质量/g。

2 结果与分析

2.1 标准品溶液配制过程引入的不确定度^[4-8]

标准溶液稀释过程中影响不确定度因素见表2。

2.1.1 标准品引入的不确定度

罗丹明B标准品证书上标称的纯度标示为97%, 由标准品纯度引入的不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{std}_A) = \frac{1 - C_s}{\sqrt{3}} = \frac{1 - 97\%}{\sqrt{3}} = 1.732\% \quad (2)$$

式中: U_{rel} 为相对不确定度; C_s 为标准品的纯度; std表示标准溶液配制过程。

2.1.2 天平误差引入的不确定度

天平允许的最大误差为±0.01 mg, 称取罗丹明B标准品1.00 mg, 取矩形分布, 引入相对标准不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{std}_B) = \frac{0.01}{\sqrt{3} \times 1} \times 100\% = 0.577\% \quad (3)$$

2.1.3 稀释标准品引入的不确定度

稀释标准品时, 使用移液器移取10 μL标准储备液于10 mL容量瓶中配制成相当于100 μg/L的标准中间液(C_m), 移液器的允许误差是8.0%, 引入的相对标准不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{std}_C) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(\text{std}_{\text{移液器}}) + U_{\text{rel}}^2(\text{std}_{10\text{ mL容量瓶}})} = \sqrt{\left(\frac{0.8\%}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.020}{\sqrt{3} \times 10}\right)^2} = 0.586\% \quad (4)$$

2.1.4 标准物质引入的总不确定度

上述各因素互不相关, 因此, 由罗丹明B标准溶液配制所产生的不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{std}) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(\text{std}_A) + U_{\text{rel}}^2(\text{std}_B) + U_{\text{rel}}^2(\text{std}_C) + U_{\text{rel}}^2(\text{std}_D)} = 2.02\% \quad (5)$$

2.2 最小二乘法拟合标准曲线求样品质量浓度时产生的不确定度^[9-13]

采用3个水平的罗丹明B标准溶液, 用高效液相色谱测定1次, 得到相应的峰面积, 用最小二乘法进行拟合, 得到拟合方程 $y = aC + b$, 以及相关系数 r (表3)。以拟合

表2 标准溶液稀释过程中的不确定度
Table 2 Uncertainty during standard solution dilution

标准溶液质量浓度/(μg/L)	容量瓶体积/mL	容量瓶允许误差/mL	移液器标称容量/μL	移液器的允许误差/%	移液器移取量/mL	容量瓶标准不确定度/mL	容量瓶相对标准不确定度/%	移液器标准不确定度/mL	移液器相对标准不确定度/%	合成相对标准不确定度 $U_{\text{rel}}(\text{std}_D)$ /%
C_m :100.0	10.0	0.02	200	2.0	0.050	0.011 5	0.115 5	0.001	0.020 0	0.203 0
C_1 :0.5	10.0	0.02								
C_2 :2.0	10.0	0.02								
C_3 :4.0	10.0	0.02	1 000	1.0	0.400	0.011 5	0.115 5	0.004	0.010 0	

注: 所用容量瓶及移液管均为A级; C_m 为标准中间液质量浓度, C_1 、 C_2 、 C_3 为标准点1、2、3的质量浓度。

的标准曲线为定量标准,对样品进行了4次测定,结果见表4。最小二乘法拟合标准曲线时引入不确定度结果见表5。

表3 线性回归测定结果及拟合方程
Table 3 Linear regression and fitted equation

$C_i/(\mu\text{g/L})$	Y_{ij}	由拟合方程计算所得 Y_i
0.000 5	12 928	13 777
0.002	22 904	30 253
0.004	43 994	52 220
$a=9\ 104\ 400$	$b=-6\ 868$	$r=0.992$

表4 样品平行测定样品的质量浓度(C_0)测量结果
Table 4 Results of parallel measurements

样品	1	2	3	4
$C_0/(\mu\text{g/L})$	0.000 74	0.000 56	0.000 55	0.000 57

由标准曲线求质量浓度时的标准不确定度由式(6)计算:

$$U(C_0) = \sqrt{\frac{S_{y/c}}{a} \left(\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{c/c}} \right)} \quad (6)$$

其中:

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m C_{ij}}{mn} \quad (7)$$

$$S_{c/c} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (C_{ij} - \bar{C})^2 \quad (8)$$

$$S_{y/c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (Y_{ij} - Y_i)^2}{mn - 2}} \quad (9)$$

式中: a 为工作曲线的斜率; p 为样品平行测定的次数; m 为标准溶液重复测定的次数; n 为所配标准溶液个数; $S_{y/c}$ 为工作曲线的标准偏差; $S_{c/c}$ 为 C_{ij} 各点的值与 \bar{C} 之差的总和; Y_{ij} 为各质量浓度点测定响应值; Y_i 为线性方程计算响应值; C_0 为样品平均质量浓度。

相对不确定度:

$$U_{\text{rel}}(C_0) = \frac{U(C_0)}{C_0} \times 100\% \quad (10)$$

表5 最小二乘法拟合标准曲线时引入不确定度
Table 5 Uncertainty resulting from least square curve fitting

p	n	$C_i/(\mu\text{g/L})$	$\bar{C}/(\mu\text{g/L})$	$S_{y/c}$	$S_{c/c}$	$U(C_0)/(\mu\text{g/L})$	$U_{\text{rel}}(C_0)/\%$
4	3	0.000 60	0.002 2	128.16	0.000 157	0.000 011	1.83

2.3 由样品制备所引入的不确定度^[14-21]

2.3.1 天平引入的不确定度

天平校准允许的最大误差为 $\pm 0.000\ 1\ \text{g}$,称取辣椒粉2 g,取矩形分布,引入的相对标准不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(m) = \frac{0.000\ 1}{\sqrt{3} \times 2} \times 100\% = 0.002\ 9\% \quad (11)$$

2.3.2 移液管引入的不确定度

使用25 mL(V_1)移液管(A级)允许的最大误差为 $\pm 0.030\ \text{mL}$,取矩形分布,由样品定容体积引入对标准的不确定度:

$$U_{\text{rel}}(V_1) = \frac{U(V_1)}{V_1} = \frac{0.03}{\sqrt{3} \times 25} \times 100\% = 0.069\ 3\% \quad (12)$$

2.3.3 定容引入的不确定度

净化完毕后,经氮气吹干的样品进行定容,使用1 mL(V_2)移液管,其允许的最大误差为0.007 mL,取矩形分布,引入的相对标准不确定度:

$$U_{\text{rel}}(V_2) = \frac{U(V_2)}{V_2} = \frac{0.007}{\sqrt{3} \times 1} \times 100\% = 0.404\ 2\% \quad (13)$$

2.3.4 凝胶渗透色谱净化过程回收率产生的不确定度

凝胶渗透色谱净化过程回收率所产生的不确定度 $U(\text{CR})$ 由3次回收率测量平均值的标准偏差 $S(\text{CR})$ 计算所得(表6):

$$U(\text{CR}) = \frac{S(\text{CR})}{\sqrt{3}} \quad (14)$$

为了确定回收率是否计入罗丹明B质量分数的计算中,应对平均回收率 \bar{R} 进行显著性检验:

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{U(\text{CR})} \quad (15)$$

当 t 大于双边临界值 $t_{(95, 2)} = 4.3$ 时,则回收率 R 有显著性差异,回收率应用以修正结果;相反,则不必使用。

表6 罗丹明B \bar{R} 显著性检验
Table 6 Significance test of rhodamine B \bar{R}

$\bar{R}/\%$	$S(\text{CR})/\%$	$U(\text{CR})/\%$	$U_{\text{rel}}(\text{CR})/\%$	t	显著性差异
58.1	5.60	3.23	5.56	1.30	不显著

2.3.5 由样品制备过程引入的总不确定度

上述各因素互不相关,因此,样品的前处理过程的不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{pre}) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(m) + U_{\text{rel}}^2(V_1) + U_{\text{rel}}^2(V_2) + U_{\text{rel}}^2(\text{CR})} = 5.57\% \quad (16)$$

2.4 测量不确定度的评定与报告

2.4.1 合成标准不确定度

$$U_{\text{rel}}(X) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(\text{std}) + U_{\text{rel}}^2(C_0) + U_{\text{rel}}^2(\text{pre})} \\ = \sqrt{0.020\ 2^2 + 0.018\ 3^2 + 0.055\ 7^2} \\ = 0.062\ 0 = 6.20\% \quad (17)$$

2.4.2 相对扩展不确定度

95%置信水平下,取 $K=2$,则:

$$U_{\text{rel}} = K \times U_{\text{crel}}(X) = 2 \times 6.20\% = 12.40\% \quad (18)$$

2.4.3 扩展不确定度

$$U = 0.002\,0 \times 12.40\% = 0.000\,2 \text{ mg/kg} \quad (19)$$

2.4.4 结果表示

用高效液相色谱法测定辣椒粉中的罗丹明B, 结果为:

$$X = (0.002\,0 \pm 0.000\,2) \text{ mg/kg}; K = 2 \quad (20)$$

3 结 论

通过对各检测环节不确定度的评估发现, 不确定度主要来自样品制备的过程中, 而制备过程中则以凝胶渗透色谱净化过程回收率的不确定度影响最大。所以, 整个检测过程的不确定度控制应以控制凝胶渗透色谱净化过程回收率的稳定性为关键, 来保障检测结果的准确性。

参考文献:

- [1] 全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治领导小组. 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)[EB/OL]. (2008-12-12). <http://www.jsbst.gov.cn/gb/jsswst/zxgz/sptjj/userobject1ai21520.html>.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL07: 2011 测量不确定度的要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2430—2010 进出口食品中罗丹明B的检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [4] 全国法制计量技术委员会. JJF 1059—1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.
- [5] 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, 2007.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 646—2006 移液器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [7] 刘征辉, 赵琳琳, 魏静娜, 等. LC-MS/MS法测定奶粉中三聚氰胺的不确定度评定[J]. 现代测量与实验室管理, 2012(2): 23-24.
- [8] 霍艳敏, 王艳丽, 王骏, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中烟酰胺的不确定度评定[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 330-333.
- [9] 杨洋, 徐春祥, 车文军. 高效液相色谱法测定奶粉中的三聚氰胺及其不确定度分析[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 250-253.
- [10] 霍晓敏. 气相色谱法对干海参中的六六六、滴滴涕测量结果不确定度的评定[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 244-248.
- [11] 崔淑华, 郭庆龙, 刘冰, 等. 液相色谱法测定鸡肉中二氯二甲吡啶酚残留量的测量不确定度评定[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 397-400.
- [12] 朱凯. HPLC法测定片剂中双氢青蒿素含量的不确定度评估[J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 2013, 30(1): 81-85.
- [13] 占永革, 黄湘燕, 龚剑. 离子色谱法测定泡菜中亚硝酸盐的测量不确定度评定[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 163-170.
- [14] 张素娟. 气相色谱法测定白酒中乙酸乙酯含量的不确定度分析[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 151-153.
- [15] 杨洋, 徐春祥, 车文军. 高效液相色谱法测定奶粉中的三聚氰胺及其不确定度分析[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 250-253.
- [16] 王莹, 张红, 曾青, 等. 气相色谱-质谱联用法测定姜中丙炔氟草胺的不确定度评定[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 176-179.
- [17] 林小莉, 董艳峰, 于静泉. 高效液相色谱法测定鸡肉中噻啉酸残留量的测量不确定度评定[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 219-222.
- [18] 蔡秋, 朱明. 高效液相色谱法测定茶饮料中苯甲酸结果不确定度评定[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 277-280.
- [19] 敬思群, 刘长勇, 刘军. HPLC测定鸡肉中呋喃唑酮的不确定度分析[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 393-396.
- [20] 李春萍. 气相色谱法测定茅台酒中甲醇及杂醇油含量的测量不确定度评估[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 177-182.
- [21] 郑怀东, 刘学光, 关丽. 气相色谱法测定河蟹中多氯联苯残留量的不确定度分析[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 334-337.