

GC-MS法测定发酵食品中氨基甲酸乙酯含量的测量不确定度评定*

谭波涛 郝媛媛

(安徽省阜阳市产品质量监督检验所,阜阳 236000)

摘要 采用气相色谱-质谱(GC-MS)法测定了发酵食品中氨基甲酸乙酯含量,找出了影响测量结果不确定度的主要因素,并用计量学方法对测量不确定度进行了评定。当发酵食品样品中氨基甲酸乙酯的测定结果为21.51 ng/mL时,其相对扩展不确定度为8.7%($k=2$)。该方法可以用于发酵食品中氨基甲酸乙酯含量的质量控制。

关键词 气相色谱-质谱联用法 氨基甲酸乙酯 发酵食品 不确定度

氨基甲酸乙酯又名聚氨酯(ethyl carbamate,简称EC)存在于发酵食品中,是一种多位点致癌物^[1]。针对发酵食品中EC的测定,目前主要以仪器分析为主,如高效液相色谱-荧光检测器法(HPLC-FLD)^[2]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[3-5]等。笔者以氨基甲酸丁酯作为内标物,采用气相色谱-质谱联用、选择离子检测模式用于发酵食品中EC的测定,并对EC测量结果的不确定度进行了评估。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪:5975C型,配多功能自动进样器,美国Agilent公司;

固相萃取装置:天津市恒奥科技发展有限公司;

旋转蒸发仪:RE-2000型,上海申胜生物技术有限公司;

超声波仪:SK1200H型,上海科导超声仪器有限公司;

去离子水发生器:AXLB1020-1型,重庆阿修罗科技发展有限公司;

甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯:色谱纯;

无水硫酸钠:经650℃灼烧4 h,置于干燥器内备用;

标准品EC、氨基甲酸丁酯:纯度均为99.0%,上海安谱科技有限公司;

实验室用水均为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Rtx®-Wax(30 m×0.25 mm,0.5 μm,美国瑞斯泰克公司)或相当者;进样口温度:220℃;柱温程序:初温40℃,保持1.0 min,以10℃/min升至60℃,再以5℃/min升至160℃,保持1.0 min,最后在220℃下运行10 min;载气:高纯氮

气(99.999%),流速:1.0 mL/min;不分流进样;进样体积:1 μL。

1.3 质谱条件

离子源(EI)温度:230℃;电子轰击能量:70 eV;接口温度:220℃;电子倍增器电压:1157 V;选择离子监测方式(SIM);EC定量离子: m/z 62;特征离子: m/z 62、74、89;内标物氨基甲酸丁酯定量离子: m/z 62;特征离子: m/z 62、74、56;溶剂延迟时间:19.0 min。

1.4 样品前处理

准确称取5.0 g固体样品或准确吸取5.0 mL液体样品于25 mL比色管中,加入氨基甲酸丁酯内标,饱和氯化钠溶液溶解并定容至刻度,振荡提取30.0 min,过滤。准确移取上述待测样液5.0 mL加到5.0 g的硅藻土液液萃取小柱上,静置吸附5 min,用30 mL二氯甲烷均分6次洗脱硅藻土萃取柱,将洗脱液用无水硫酸钠过滤后于30℃下旋干,用乙酸乙酯定容至5.0 mL,混匀,待测。

1.5 标准曲线的绘制

准确称取氨基甲酸丁酯0.1042 g于100 mL棕色容量瓶中,用乙酸乙酯溶解并定容至刻度,配制成浓度为1.042 mg/mL的氨基甲酸丁酯标准储备液。准确称取EC 0.1057 g于100 mL棕色容量瓶中,乙酸乙酯溶解并定容至刻度,配制成浓度为1.057 mg/mL的EC标准储备液。准确吸取EC、氨基甲酸丁酯的标准储备液,乙酸乙酯溶解逐级稀释,配制成EC与内标物浓度的比值分别为0.05、0.1、0.2、0.5、1.0且内标物浓度为400 ng/mL的标准校正溶液系

* 安徽省食品安全地方标准2010年制定项目;安徽省质量技术监督局2011年科技计划项目(ZJY-019)

收稿日期:2011-05-26

列浓度供 GC-MS 测定。

1.6 定性定量

吸取 1 μL 试样液或标准液注入气质联用仪中, 以 EC 与内标物浓度的比值为横坐标, EC 与内标物的峰高比值为纵坐标, 绘制标准工作曲线。以试样峰与内标峰的相对保留时间定性, 以试样峰与内标峰的定量离子峰高比多点校正后定量。

2 数学模型

样品中 EC 含量测量结果可以表示为:

$$X = \frac{A_{\text{sn}} m_s f_v}{A_{\text{sl}} m R} \quad \text{其中 } R = \frac{A_n c_1}{A_1 c_n}$$

式中: X —试样中 EC 含量, ng/g;

A_{sn} —实际样品中 EC 的峰高;

A_{sl} —实际测定时, 内标物氨基甲酸丁酯的峰高;

m_s —实际测定时, 内标物氨基甲酸丁酯的质量, ng;

m —样品质量, g;

f_v —实际测定时样品和内标物稀释倍数;

R —EC 及其内标物氨基甲酸丁酯的相对校正因子,

A_n —EC 样品的峰高;

c_1 —内标物氨基甲酸丁酯的浓度, ng/mL;

A_1 —内标物氨基甲酸丁酯的峰高;

c_n —EC 的浓度, ng/mL。

3 测定结果

5 个标准溶液分别测量 3 次, 结果见表 1、表 2。

表 1 EC-氨基甲酸丁酯标准校正液峰高系列测定结果

EC 与内标物浓度比值	测量 1		测量 2		测量 3	
	标准品 A_{ni}	内标 A_{li}	标准品 A_{ni}	内标 A_{li}	标准品 A_{ni}	内标 A_{li}
1:20	2702	42511	2630	42394	2864	42621
1:10	5493	42587	5329	42201	5401	42510
1:5	10760	40958	10622	40665	10645	40080
1:2	30172	46576	30202	46680	29543	46197
1:1	40308	30845	40730	31001	40603	30947

表 2 EC-氨基甲酸丁酯标准校正液中标准品峰高(A_{ni})与内标峰高(A_{li})之比的测定结果

EC 与内标物浓度比值	A_{ni}/A_{li}			平均值 \bar{x}_i
1:20	0.0636	0.0620	0.0672	0.0643
1:10	0.1289	0.1263	0.1270	0.1274
1:5	0.2627	0.2612	0.2656	0.2632
1:2	0.6478	0.6470	0.6395	0.6448
1:1	1.3068	1.3138	1.3120	1.3109

根据表 1 和表 2 数据作标准工作曲线, 线性方程为 $y = 1.310225x - 0.002434$, 其中曲线相关系数

$r = 0.9999, b = 1.310225, a = -0.002434$ 。当内标浓度为 400 ng/mL 时, 重复性条件下测定样品 6 次, 对应的样品浓度比和样品测定结果见表 3。

表 3 样品测定结果

参数	测定值			平均值
样品中 EC 和内标物峰高比	0.06760	0.06790	0.06816	0.06776
	0.06710	0.06843	0.06738	
样品中 EC 和内标物浓度比	0.05345	0.05368	0.05388	0.053575
	0.05307	0.05409	0.05328	
样品中 EC 浓度 $c_i/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	21.381	21.472	21.552	21.43
	21.228	21.634	21.314	

4 发酵食品中 EC 测量结果的不确定度评定

从实验方法和数学模型可以看出, 检验由标准液制备、样品制备、仪器测定等几部分组成。因此测量不确定度的主要来源有(1) EC 及其内标物氨基甲酸丁酯相对校正引入的不确定度; (2) 内标物纯度及样品和内标物称量引入的不确定度; (3) 定容配制测量液、进样引入的测量不确定度; (4) 实际测量过程中, 样品中 EC 的峰高和内标物氨基甲酸丁酯的峰高比($A_{\text{sn}}/A_{\text{sl}}$)引入的不确定度; (5) 重复性测量引入的不确定度。

4.1 EC 及其内标物氨基甲酸丁酯校正引入的不确定度

(1) 拟合标准工作曲线求值引入的不确定度

以 EC 与内标物浓度的比值 X 为横坐标, EC 与内标物的峰高比值 Y 为纵坐标绘制标准工作曲线, 曲线的斜率即为相对校正因子 R 。根据表 1 和表 2 数据, 标准工作曲线中残余标准差 S 和标准工作曲线中自变量偏差平方和 S_{xx} 分别为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n [A_{ji} - (a + bc_i)]^2}{mn - 2}} = 0.005459$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2 = 1.854$$

测量样品溶液 6 次, 即 $P=6$, 根据表 3 数据, 样品溶液由于拟合标准工作曲线求值引入的不确定度为:

$$u_R(x_0) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{nm} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \\ = \frac{0.005459}{1.310225} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{15} + \frac{(0.05375 - 0.037)^2}{1.854}} \\ = 0.002013$$

其相对标准不确定度:

$$u_{R,\text{rel}} = \frac{u_R(x_0)}{x_0} = 0.0376$$

(2) EC-氨基甲酸丁酯标准校正液浓度比引入的测量不确定度

配制 EC-氨基甲酸丁酯标准校正液时,EC 标准品和内标标准品称量、定容等过程将引入不确定度。但是使用线性最小二乘法拟合曲线、求取相对校正因子的前提是假定横坐标量的不确定度远小于纵坐标量的不确定度^[6,7]。通常的 A_n/A_l 不确定度计算程序仅仅与 EC 和内标物的峰高比值有关,而与 EC-氨基甲酸丁酯标准校正液不确定度无关,也不与从同一溶液中逐次稀释产生必然的相关性,因此 EC-氨基甲酸丁酯标准校正液浓度比引入的测量不确定度可以忽略不计。

4.2 内标物纯度及样品和内标物称量引入的不确定度

(1) 根据氨基甲酸丁酯的标准物质证书,标样的相对标准不确定度为 1.0%,按照正态分布估算,取包含因子为 3。则内标的相对标准不确定度 $u_{nl,rel}$ 约为 0.0034。

(2) 电子天平经检定合格,根据其检定证书和产品附机参数,电子天平的线性和重复性分别为 $\pm 0.1 \text{ mg}$,计算标准不确定度时假设其为矩形分布。实际测量时分别称量内标约 0.1 g,样品约 5 g,由于使用电子天平去皮测量,去皮前后两次测量结果强相关,称量内标和样品质量时引入的标准不确定度 u_n 和 u_m 均为 $2 \times \sqrt{(0.1^2 + 0.1^2)/3} \text{ mg}$,即 0.164 mg。其相对标准不确定度 $u_{n,rel}$ 、 $u_{m,rel}$ 分别约为 0.0016、0.0001。

4.3 实际测量时,内标物称量、定容配制测量液引入的测量不确定度

(1) 使用容量瓶、移液管或移液枪所引入的体积不确定度主要有 3 个分量:①体积校准引入的不确定度分量 u_{V1} ,按 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》和 JJG 646-2006《移液器检定规程》规定的容量允差计算;②充满液体至刻度的变动性引入的不确定度分量 u_{V2} ,通过 A 类不确定度评定得到,具体做法为连续核查 10 次排出的体积的标准偏差(通过称量决定);③溶液温度与检定标准温度(20℃)不同引入的不确定度分量 u_{V3} ,根据溶液体积膨胀系数计算。

(2) 在计算标准不确定度时,对证书或其它说明书给出区间但未说明置信水平的,如温度对定容体积的影响等,按矩形分布($k = \sqrt{3}$)计算不确定

度;对给出区间却未说明置信水平,但有理由认为不大可能为极端值的,如量瓶、移液管等玻璃仪器的校准不确定度,采用三角分布($k = \sqrt{6}$)计算不确定度^[8]。

(3) 在估算温度变化对体积不确定度影响时,认为实验室的温度一般在 $\pm 4^\circ\text{C}$ 之间变动。液体体积膨胀明显大于容量瓶的体积膨胀,因此只需考虑前者。乙酸乙酯的体积膨胀率按照 20℃ 时系数 $1.39 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$ 计算。根据实验情况,各体积不确定度见表 4。

表 4 容量瓶、移液管或移液枪引入的相对标准不确定度

量具	容量允差/mL	$u_{V1,rel}/\%$	$u_{V2,rel}/\%$	$u_{V3,rel}/\%$	$u_{V,rel}/\%$
25 mL 比色管	± 0.03	0.049	0.080	0.321	
5 mL 移液管	± 0.015	0.123	0.039	0.321	0.603
5 mL 容量瓶	± 0.020	0.164	0.039	0.321	

4.4 样品测量中 EC 的峰高和内标物氨基甲酸丁酯的峰高比(A_{sn}/A_{sl})引入的不确定度

样品中 EC 的峰高和内标物氨基甲酸丁酯的峰高比(A_{sn}/A_{sl})引入的不确定度主要来源于仪器取样时引入的不确定度和仪器对检测信号响应产生的不确定度等。对 A_{sn}/A_{sl} 引入的不确定度可采用表 2 的数据按照 A 类不确定度进行评定。以 EC 标准品峰高(A_{ni})和内标峰高(A_{ti})的比值 A_i 与同一水平下比值平均值 \bar{A}_i 之比 A_i/\bar{A}_i 作为被观测量,构建观测列数据,合并样本标准差,得到样品测量中 EC 的峰高和内标物氨基甲酸丁酯的峰高比(A_{sn}/A_{sl})引入的相对标准不确定度:

$$u_{A_{sn}/A_{sl},rel} = \sqrt{\frac{1}{m(n-1)} \sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (A_{jk}/\bar{A}_j - 1)^2} = 0.0198$$

4.5 重复性测量引入的不确定度

重复性测量引入的不确定度采用 A 类评定。表 3 数据在格拉布斯检验 0.95 置信水平下无粗大异常值。根据贝塞尔公式,计算 6 次测量标准差的相对值为:

$$s(\bar{q}) = \frac{1}{c} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (c_i - \bar{c})^2}{6-1}} = 0.00708$$

实测时以双试验平均值表示测量结果时,测量结果的 A 类相对标准不确定度: $u_{c,rel} = s(\bar{q})/\sqrt{2} = 0.00501$ 。

5 相对合成标准不确定度和相对扩展不确定度

根据以上评估过程,将不确定度的 A 类评定结

果和各分量评估结果合成,得出相对合成标准不确定度:

$$u_{\text{rel}} = \sqrt{u_{R,\text{rel}}^2 + u_{n1,\text{rel}}^2 + u_{n2,\text{rel}}^2 + u_{m,\text{rel}}^2 + u_{V,\text{rel}}^2 + u_{A_m/A_{sl},\text{rel}}^2 + u_{c,\text{rel}}^2} \\ = 0.0434$$

以任意两次测量结果平均值为检测结果(如第1次测量和第5次测量), $\bar{X}=21.51\text{ ng/mL}$,取包含因子 $k=2$,则发酵食品中EC含量的测量结果及其相对扩展不确定度可表示为:

$$X=21.51\text{ ng/mL}, U_{\text{rel}}=8.7\%, k=2。$$

6 结语

通过对发酵食品中EC含量测量过程中影响测量结果不确定度的各因素进行分析,结果表明,在测量结果的合成不确定度中,拟合标准曲线求值引入的不确定度分量贡献最大,其次是由样品测量中EC的峰高和内标物氨基甲酸丁酯的峰高比($A_{\text{sn}}/A_{\text{sl}}$)引入的不确定度分量。其原因是由于检测器的计量特性、样品分离条件和检测重复性引入了较大的不确定度。由于测定采用了内标法,进样量变化和实验条件变化引入的误差将因为测定的峰高比($A_{\text{sn}}/A_{\text{sl}}$)而相互抵消。合理选择样品分离条件、提高仪器精

度、提高操作人员技能、保证人员规范操作、合理选择内标物的浓度、使其峰高与待测组分峰高不要相差太大,都可以有效减少不确定度,保证测量结果的准确、可靠。

参 考 文 献

- [1] European Food Safety Authority. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages Scientific Opinion of the Panel on Contaminants[J]. The EFSA Journal, 2007, 551:1-44.
- [2] Arminda Alves, Beatriz Oliveira, Paulo Herbert. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC - FLD with GC - MS methods[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382:498-503.
- [3] AOAC Official Method 994.07 Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Soy Sauce Gas Chromatography/Mass Selective Detection Method[S].
- [4] 刘晓毅,刘艳琴,赵玉琪,等.酱油中的氨基甲酸乙酯检测方法研究[J].中国调味品,2010,35(1):81-84.
- [5] 高年发,宝菊花.氨基甲酸乙酯的研究进展[J].中国酿造,2006,162(9):1-4.
- [6] JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示[S].
- [7] CNAS-G106 化学分析中不确定度的评估指南[S].
- [8] Eurachem/Citac Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement[S].

UNCERTAINTY EVALUATION OF DETERMINATION OF ETHYL-CARBAMATE IN FERMENTED FOOD BY GC-MS

Tan Botao, Hao Yuanyuan

(Fuyang Product Quality Supervision and Inspection Institute, Fuyang 236112, China)

ABSTRACT The ethyl-carbamate in fermentation foods was determined by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS). The sources of the uncertainty were analyzed for whole measurement procedure, and the determination uncertainty was evaluated by metrological method. As the content of ethyl-carbamate in fermentation foods was 21.51 ng/mL, the relative expanded uncertainty was 8.7% ($k=2$). This method can be used to control the quality of the ethyl-carbamate content in fermented food.

KEYWORDS gas chromatography-mass spectrometry, ethyl-carbamate, fermented food, uncertainty

欢 迎 查 询 有 广 告

对于在我刊刊登的所有广告,如读者需要查询更详细的资料或了解情况,请填好《读者查询广告资料服务卡》后寄回或来函。本杂志社将为您提供或转请有关单位提供资料,以满足您的要求。如需购买任何广告单位的材料、设备、仪器及配件等产品,我社将帮助您联系,以保证产品质量,争取优惠价格。欢迎各单位在我刊刊登广告。刊登办法函索即寄。

《化学分析计量》读者查询广告资料服务卡

No _____

读者姓名_____ 单位_____ 邮政编码_____

通讯地址_____ 电话_____ E-mail_____

欲获得《化学分析计量》_____年第_____期第_____页_____

广告中有关_____ 的详细资料。

如空位不够,请另附纸。填好后请寄回。

山东省济南市108信箱杂志社

邮政编码:250031