

顶空-气相色谱法测定动物源制品中三甲胺含量的测量不确定度评定

应月, 刘超晔, 孙杰, 张莹 (南京市食品药品监督检验院, 江苏南京 210000)

摘要 [目的]分析顶空-气相色谱法(HS-GC)测定动物源制品中三甲胺含量的测量不确定度来源并定量。[方法]建立(HS-GC)测定动物源制品中三甲胺含量的测量不确定度评定的数学模型,从测定程序各步骤评定不确定度的各项来源,对该方法所得结果的已识别来源的不确定度影响进行评价。[结果]该方法测定动物源制品中三甲胺含量的不确定度主要来源于三甲胺盐酸盐标准溶液及样品处理过程。当动物源制品中三甲胺含量为 9.20 mg/kg 时,其扩展不确定度为 0.56 mg/kg($K=2, P=95\%$)。[结论]该评定方法在实际工作中对提高三甲胺检测数据的可靠性与准确性具有一定指导意义。

关键词 动物源制品;三甲胺;顶空气相色谱法;不确定度

中图分类号 S851.34⁺7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)20-0089-02

Evaluation of Uncertainty in Determination of Trimethylamine in Animal Derived Food by Headspace Gas Chromatography
YING Yue, LIU Chao-ye, SUN Jie et al (Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing, Jiangsu 210000)

Abstract [Objective] A mathematical model was established to assess the uncertainty in determination of trimethylamine in animal derived food by headspace gas chromatography. [Method] Various sources of uncertainty for measurement results during the analysis have been evaluated and the identified key factors were assessed. In this paper, the impacts of major source of measurement uncertainty were methanol standard solution and sample preparation. [Result] The uncertainty of trimethylamine in animal derived food determined by HS-GC originated mainly from trimethylamine standard liquid and sample treatment. When the trimethylamine content in animal derived food was 9.20 mg/kg, the expanded uncertainty of measurement results was 0.56 mg/kg($K=2, P=95\%$). [Conclusion] This uncertainty evaluation method shows certain guiding significance to improve the reliability and the accuracy of trimethylamine detection in practical work.

Key words Animal derived food; Trimethylamine; Headspace gas chromatography; Uncertainty

人类食用的鱼、虾、猪等肉产品随着新鲜程度下降,在微生物和酶的作用下不断降解生成三甲胺^[1-2]。从食物中获取的三甲胺可在肝脏中转化成氧化三甲胺,有研究证明,人体内过量氧化三甲胺可促使人体动脉粥样硬化,导致心血管病发病^[3-4]。因此,检测动物源制品中三甲胺含量对判断其新鲜程度、提高其食用安全、保障消费者身体健康意义重大^[4-6]。

在检验分析工作中,不确定度是测定结果质量的衡量尺度。此前我国三甲胺检测采用 GB/T 5009.179—2003《火腿中三甲胺氮的测定》,该标准采用分光光度法测定与苦味酸作用形成的苦味酸三甲胺盐,但是苦味酸可与样品中其他胺类物质反应,故而使测定结果偏高,此标准已于 2017 年 3 月 1 日废止^[7]。笔者结合 GB 5009.179—2016《食品安全国家标准 食品中三甲胺的测定》(第二法顶空-气相色谱法)^[8]中的检测方法进行试验操作,按照 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》^[9]建立三甲胺的顶空-气相色谱法(HS-GC)检测结果数学模型,分析检测过程中的不确定度来源并定量。该不确定度评定结果可为规范动物源制品中三甲胺测定步骤、提高测定精密度和准确性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 7890 气相色谱仪带 7697A 顶空,配氢火焰离子化检测器(FID),安捷伦公司;三甲胺盐酸盐标准品,美国 Chem service;其他试剂三氯乙酸、氢氧化钠均为分析纯。

1.2 三甲胺标准溶液制备 三甲胺标准储备液:称取三甲胺盐酸盐标准品 0.016 2 g,用 5% 三氯乙酸溶液溶解并定容

至 100 mL,等同浓度为 100 μg/mL 的三甲胺标准储备液,4 ℃ 保存。分别精密移取三甲胺标准储备液 1、2、5、10 至 100 mL 容量瓶,10、20 mL 至 50 mL 容量瓶,用 5% 三氯乙酸定容,得到浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 μg/mL 的标准工作溶液。

1.3 方法 采用 GB 5009.179—2016《食品安全国家标准 食品中三甲胺的测定》中“第二法”规定的方法,称取约 10 g 制备好的样品于 50 mL 的塑料离心管中,加入 20 mL 5% 三氯乙酸溶液,用均质机均质 1 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,上清液滤入 50 mL 容量瓶,残留物再分别用 15 和 10 mL 5% 三氯乙酸溶液重复上述提取过程 2 次,合并滤液并用 5% 三氯乙酸溶液定容至 50 mL。

分别准确吸取样品提取液、三甲胺标准工作液各 2.0 mL 于 20 mL 顶空瓶中,压盖密封,用医用塑料注射器准确注入 5.0 mL 50% 氢氧化钠溶液,备用。制备好的试样在 40 ℃ 平衡 40 min,供 HS-GC 测定。以保留时间定性,外标法采用峰面积定量。

1.4 HS-GC 条件 石英毛细管色谱柱:聚乙二醇(30.00 m×0.25 mm×0.25 μm);柱温箱:40 ℃ 保持 3 min,以 20 ℃/min 速率升至 220 ℃,保持 1 min;载气:氮气(纯度 99.999%),流速为 1.0 mL/min;进样口温度 220 ℃;自动进样,进样量 1.0 μL;分流进样,分流比 2:1。

1.5 数学模型 建立试样中三甲胺含量的测定模型如下:

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

式中, X 为试样中三甲胺含量(mg/kg); c 为从校准曲线得到的三甲胺浓度(mg/mL); V 为试样溶液定容体积(mL); m 为试样质量(g)。

三甲胺含量 X 的相对标准不确定度用 $u_{rel}(x)$ 表示,试样

作者简介 应月(1986—),女,江苏沐阳人,工程师,硕士,从事食品安全检测分析研究。

收稿日期 2017-04-14

溶液定容体积的相对标准不确定度用 $u_{\text{rel}(\text{V})}$ 表示,试样质量 m 的相对标准不确定度用 $u_{\text{rel}(\text{m})}$ 表示,总重复性带来的相对标准不确定度用 $u_{\text{rel}(\text{x})}$ 表示。其中 c 引起的相对不确定度 $u_{\text{rel}(\text{c})}$ 主要由标准曲线回归带来的相对标准不确定度 u_{fitrel} 和标准品溶液带来的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}(\text{c0})}$ 引起。由此得到的相对标准不确定度传播率为:

$$u_{\text{rel}(\text{x})} = \sqrt{u_{\text{rel}(\text{c})}^2 + u_{\text{rel}(\text{V})}^2 + u_{\text{rel}(\text{m})}^2 + u_{\text{rel}(\text{x})}^2}$$

2 不确定度评定

2.1 标准溶液引入的不确定度

2.1.1 标准物质引入的不确定度。由标准物质证书可知,三甲胺盐酸盐的不确定度为 0.5%,按正态分布 $k=3$,其相

对不确定度为 $u_{\text{p1rel}} = \frac{0.5\%}{3} = 1.67 \times 10^{-3}$ 。

2.1.2 标准工作溶液配制过程引入的不确定度。

2.1.2.1 标准品称量引起的不确定度。用精度为 0.01 mg 天平准确称取三甲胺盐酸盐标准品 0.016 2 g,服从均匀分布 $k=\sqrt{3}$ 。忽略称量重复性引入的不确定度。标准品称量的相对标准不确定度为 $u_{\text{p2rel}} = \frac{0.01}{16.2 \times \sqrt{3}} = 3.56 \times 10^{-4}$ 。

2.1.2.2 玻璃仪器校准引入的不确定度。标准工作液配制过程需要使用一系列玻璃量器,按均匀分布属 A 类,取 $k=\sqrt{3}^{[10]}$,结果见表 1。

表 1 单标线玻璃容量瓶及移液管校准的不确定度

Table 1 The uncertainty of glass volumetric flask and transfer pipette

玻璃量器编号 Glass container No.	玻璃量器规格(A级) Glass container specifications(Level A)	最大允许误差 Maximum permissible error//mL	相对标准不确定度 Relative Standard uncertainty
1	100 mL 单线标容量瓶	±0.10	$u_1 = 5.77 \times 10^{-4}$
2	50 mL 单线标容量瓶	±0.05	$u_2 = 5.77 \times 10^{-4}$
3	20 mL 单线标移液管	±0.06	$u_3 = 1.73 \times 10^{-3}$
4	10 mL 单线标移液管	±0.020	$u_4 = 1.15 \times 10^{-3}$
5	5 mL 单线标移液管	±0.015	$u_5 = 1.73 \times 10^{-3}$
6	2 mL 单线标移液管	±0.010	$u_6 = 2.89 \times 10^{-3}$
7	1 mL 单线标移液管	±0.007	$u_7 = 4.04 \times 10^{-3}$

按照标准工作液配制过程,由表 1 数据合成的相对不确定度为

$$u_{\text{p3rel}} = \sqrt{u_7^2 + u_1^2 + u_6^2 + u_1^2 + u_5^2 + u_1^2 + u_4^2 + u_1^2 + u_4^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_2^2} = 5.71 \times 10^{-3}$$

2.1.2.3 温度引起的不确定度。试验所用玻璃量器在 20 ℃ 校准,实验室检测温度约为 25 ℃。20 ℃ 时水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/\text{℃}$,玻璃的膨胀系数为 $1.5 \times 10^{-5}/\text{℃}$,在置信概率下的正态分布取 $k=2$,则 $u_{\text{Trel}} = (\sigma_{\text{水}} - \sigma_{\text{玻}}) \times (T_i - T_{20}) \times \frac{1}{2} = 4.88 \times 10^{-4}$ 。得到标准品溶液带来的相对标准不

确定度为 $u_{\text{rel}(\text{c0})} = \sqrt{u_{\text{p1rel}}^2 + u_{\text{p2rel}}^2 + u_{\text{p3rel}}^2 + u_{\text{Trel}}^2} = 1.67 \times 10^{-2}$ 。

2.1.3 标准曲线引入的不确定度。按照“1.2”配制标准工作液,浓度及相应的峰面积见表 2。采用最小二乘法拟合得到标准曲线的回归方程: $y=131.357\ 7x-53.136\ 2$,相关系数 $R^2=0.999\ 6$ 。同一样品,重复测定 6 次,得到三甲胺平均含量为 1.84 μg/mL。

由标准曲线引入的标准不确定度按下式计算^[11]: $u_{\text{rel}(\text{fit})} = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c-\bar{c})^2}{s_{\text{xx}}}} = 1.88 \times 10^{-2}$ 。式中, s 为残差标准偏差, $s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (b + a \times c_j)]^2}{n-2}} = 3.16$; p 为样品测定次数, $p=6$; n 为校准的次数, $n=3$; c 为样品通过曲线求得的浓度(μg/mL); $\bar{c}$ 为标准曲线 6 个浓度的平均值(μg/mL); s_{xx} 为离均差平方和, $s_{\text{xx}} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2 = 1\ 116$ 。得出标准曲线查得三甲胺浓度的不确定度为 $u_{\text{rel}(\text{c})} = \sqrt{u_{\text{rel}(\text{fit})}^2 + u_{\text{rel}(\text{c0})}^2} = 2.52 \times 10^{-2}$ 。

2.2 样品引入的不确定度

2.2.1 样品取样的不确定度。该试验检测过程中将样品经充分混匀后称量,认为样品具有较好的均匀性,代表性充分,忽略取样所致的不确定度^[12]。

表 2 标准工作液浓度及峰面积

Table 2 The concentrations and peak area of standard workig solution

标准工作溶液浓度 Concentrations of standard workig solution//μg/L	峰面积 Peak area		
	重复 1 Repetition 1	重复 2 Repetition 2	重复 3 Repetition 3
1.0	165.57	166.14	164.98
2.0	323.16	321.16	318.15
5.0	606.65	605.21	604.88
10.0	1 312.48	1 310.90	1 316.25
20.0	2 564.60	2 654.68	2 689.76
40.0	5 260.66	5 243.21	5 224.52

2.2.2 样品称量引入的不确定度。用精度为 0.01 mg 的天平准确称取 10 g 样品,按均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$ 。天平读数稳定,忽略称量重复性引入的不确定度。样品称量的相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}(\text{m})} = \frac{0.01}{10 \times 1\ 000 \times \sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-7}$ 。

2.2.3 样品定容体积引入的不确定度。试验用 50 mL 容量瓶,按均匀分布评定, $u_{\text{vrel}} = \frac{0.05}{50 \times \sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-4}$ 。实验室检测温度为 25 ℃。在置信概率下的正态分布取 $k=2$,则 $u_{\text{Trel}} = 4.88 \times 10^{-4}$ 。 $u_{\text{rel}(\text{v})} = \sqrt{u_{\text{v1rel}}^2 + u_{\text{Trel}}^2} = 7.55 \times 10^{-4}$ 。

分光光度法测定所获得的检验结果具有检出限低、精密度好、安全快捷、有机酸消耗量少的优势。该方法适用于蛋白质、脂肪、糖类物质含量高的样品的测定,既能克服传统湿热消解有毒试剂消耗量大、安全隐患高、效率低的缺点,又可防止消解过程中磷的挥发损失,具有环保、安全、准确、高效的优点,同时可以降低空白值,保证结果准确^[21-23]。

参考文献

- [1] LIY H, ZHANG L W, WANG W J, et al. Differences in particle characteristics and oxidized flavor as affected by heat-related processes of milk powder[J]. Journal of dairy science, 2013, 96(8): 4784-4793.
- [2] WANG X Y, GUO H Y, ZHANG W, et al. Effect of iron saturation level of lactoferrin on osteogenic activity *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of dairy science, 2013, 96(1): 33-39.
- [3] 于景华. 我国奶粉的质量安全问题与控制现状[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(6): 7-10.
- [4] 邓杰. 早产与低出生体重儿配方奶粉的研制[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [5] 柏丹丹. 母乳营养成分含量的测定[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [6] CHEN S M. Sham or shame: Rethinking the China's milk powder scandal from a legal perspective[J]. Journal of risk research, 2009, 12(6): 725-747.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 婴幼儿食品和乳品中磷的测定: GB 5413. 22—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 婴儿配方食品: GB 10765—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 较大婴儿和幼儿配方食品: GB 10767—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 特殊医学用途婴儿配方食品通则: GB 25596—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 婴幼儿谷类辅助食品: GB 10769—2010[S].

(上接第 90 页)

2.2.4 样品处理步骤引入的不确定度。样品制备过程引入的不确定度,以 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为三甲胺质量浓度,进行 6 次空白样品添加回收率试验,回收率结果分别为 86.17%、92.35%、88.22%、84.53%、90.97%、93.26%,平均回收率 $\bar{f}_{\text{回}}$ 为 89.25%,标准偏差 $s = 3.50$, $u_{\text{rel}(\bar{x})} = \frac{3}{\sqrt{n}} \times \frac{1}{\bar{f}_{\text{回}}} = 1.60 \times 10^{-2}$,式中 $n = 6$ 。

2.3 计算合成不确定度 该试验得出 HS-GC 测定肉制品中三甲胺含量的合成标准不确定度为 $u_{\text{rel}(x)} = \sqrt{u_{\text{rel}(c)}^2 + u_{\text{rel}(v)}^2 + u_{\text{rel}(m)}^2 + u_{\text{rel}(\bar{x})}^2} = 3.02 \times 10^{-2}$ 。

2.4 扩展不确定度及结果 取扩展因子 $K = 2$,在 95% 置信水平下,相对扩展不确定度为 $U_{\text{rel}(x)} = K u_{\text{rel}(x)} = 6.04 \times 10^{-2}$ 。试验数据中,样品三甲胺含量为 9.20 mg/kg,则其扩展不确定度为 $U = 0.56 \text{ mg/kg}$,三甲胺的测定结果为 $(9.20 \pm 0.56) \text{ mg/kg}$ 。

3 讨论

通过对不确定度的计算评定,了解试验过程中不确定度的来源,并进行分析和量化,从而判断出可对哪些不确定度分量采取措施,以降低总不确定度。该试验中,HS-GC 测定肉产品中三甲胺含量,测定结果为 $(9.20 \pm 0.56) \text{ mg/kg}$ ($K = 2, P = 95\%$)。通过比较,发现三甲胺标准溶液引入的不确定度和样品处理步骤引入的不确定度对测定结果不确定度的

北京:中国标准出版社,2010.

- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 特殊医学用途配方食品通则: GB 29922—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [13] 李巧玲,陈则华. 微波消解光度法测定奶粉中的磷[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 302-305.
- [14] 卫敏,刘钟栋. 食品中磷的检测方法[J]. 中国科学:化学, 2010, 40(7): 914-921.
- [15] VAN DALEN G. Determination of the phosphorus and sulphur content in edible oils and fats by wavelength-dispersive x-ray fluorescence spectrometry[J]. X-Ray Spectrometry, 1998, 27(1): 26-30.
- [16] JASTRZEBSKA A, HOL A, SZLYK E. Simultaneous and rapid determination of added phosphorus(V) compounds in meat samples by capillary isotachopheresis[J]. LWT-Food science and technology, 2008, 41(10): 2097-2103.
- [17] 郭丽萍,唐娟. 微波消解-电感耦合等离子体发射光谱法测定茶叶中的微量元素[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 303-307.
- [18] 徐艳秋,陈国娟,董浩,等. 微波消解-电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)测定茶叶中多种微量元素[J]. 饮料工业, 2011, 14(8): 46-48.
- [19] 陈新坤. 原子发射光谱分析原理[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1991.
- [20] 中国国家标准委员会. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [21] ZHAO X Y, LIU Y H, XU Y Z, et al. ICP-OES determination of inorganic elements in *Panax quinquefolium* L. and its processed products[J]. Medicinal plant, 2012(12): 14-18.
- [22] 王艳泽,王英锋,施燕支,等. 微波消解 ICP-MS 法测定根和根茎类生药中 11 种微量元素[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(12): 2326-2329.
- [23] D'LLIO S, IOLANTE N, MAJORANI C, et al. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review[J]. Analytica chimica acta, 2011, 698(1/2): 6-13.

贡献较大,样品称量与定容对三甲胺测定结果影响较小。在今后实际检测工作中,应尽可能规范试验操作,提高检测结果的准确性。

参考文献

- [1] 田映,巴尔. 气相色谱法测定猪肉中三甲胺[J]. 中国卫生检验杂志, 2010(1): 227.
- [2] 邓后勤,夏延斌,邓友光,等. 三甲胺测定方法的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 84-88.
- [3] 陈锦文,崔燕芒,赵燕. 三甲胺、二甲胺及氧化三甲胺含量测定方法的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(2): 216-219.
- [4] 王伟占,田凤石. 氧化三甲胺与动脉粥样硬化关系研究进展[J]. 天津医药, 2015, 43(4): 443-445.
- [5] 周妍,闻陆,毛燕妮,等. 顶空气相色谱-质谱法测定动物源性食品中三甲胺[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(16): 2683-2685.
- [6] 唐森,李军生,吴明凯,等. 应用三甲胺/氧化三甲胺摩尔比值评价食用鱼粉的新鲜程度[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2015(12): 151-154.
- [7] 浙江省东阳市卫生防疫站. 火腿中三甲胺氮的测定: GB/T 5009.179—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中三甲胺的测定: GB 5009.179—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [9] 江苏省计量科学研究院,中国计量科学研究院,北京理工大学,等. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [10] 河南省计量科学研究院. 常用玻璃量器检定规程: JJG 196—2006[S]. 北京:中国计量出版社,2007.
- [11] 俞慧红. 气相色谱法测定大米中马拉硫磷的不确定度评定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(35): 148-150.
- [12] 全国统计方法应用标准化技术委员会. 利用重复性、再现性和正确度的估计值评估测量不确定度的指南: GB/Z 22553—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.