

HPLC测定原料乳与乳制品中三聚氰胺质量分数的不确定度评定

汪辉,彭新凯,曹小彦,胡朝晖,何红梅

(长沙市食品安全质量监督检测中心,长沙 410013)

摘要:建立高效液相色谱法测定原料乳与乳制品中三聚氰胺质量分数的不确定度评定方法,采用GB/T22388-2008高效液相色谱法测定原料乳与乳制品中三聚氰胺质量分数。建立数学模型,根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059-1999)中有关规定评估其不确定度。结果表明,按数学模型计算奶粉中三聚氰胺质量分数为2.70 mg/kg,扩展不确定度为0.064 mg/kg,结果表达为(2.70±0.064)mg/kg。该方法建立的数学模型合理、可靠。

关键词:高效液相色谱;原料乳;乳制品;三聚氰胺;不确定度

中图分类号:TS252.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-2230(2010)03-0058-04

Uncertainty evaluation of high performance liquid chromatographic determination of melamine in raw milk and dairy products

WANG Hui, PENG Xin-kai, CAO Xiao-yan, HU Zhao-hui, HE Hong-mei

(Changsha Center of Supervision and Inspection on Food Quality Safety, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective: A assess method of measuring uncertainty was established according to GB/T22388-2008 which determined melamine in raw milk and dairy products by HPLC. Methods: A mathematical model was established which evaluated uncertainty according to "Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement". Results: The content of milk powder was 2.70 mg/kg according to mathematical model established in the study, expanded uncertainty was 0.064 mg/kg, and the expression of uncertainty was (2.70±0.064) mg/kg. Conclusion: The mathematical model was established was logical and credible.

Key words: HPLC; raw milk; dairy products; melamine; uncertainty

0 引言

三聚氰胺(melamine)又称三氨三嗪,简称三胺,为白色或无色结晶是一种重要的氮杂环有机化工原料^[1]。三聚氰胺分子中含有大量氮元素,普通的全氮测定法测蛋白质含量时不能排除这类伪蛋白氮的干扰,因而一些厂商为了能低成本而添加这种化工原料,以提高产品中蛋白质含量。

测量不确定度对实验室间比对、测量结果临界值的判断、方法的确认以及检测工作国际化等方面,都有重要的意义。目前,我国检测三聚氰胺的方法已比较成熟,相关文献也较多^[2-5],且已有农业部标准Y/T137222007、国家标准GB/T22388-2008、GB/T22400-2008。本实验根据国家计量技术规范的要求,结合日常的检测工作,进行HPLC测定原料乳与乳制品中三聚氰胺质量分数(GB/T22388-2008)的测量不确定度评估^[6]。

收稿日期:2009-11-11

作者简介:汪辉(1983-),男,助理工程师,主要从事食品质量安全分析与研究。

通讯作者:曹小彦

1 实验

1.1 主要仪器与试剂

Waters1525高液相色谱仪配2996二极管阵列检测器,717Plus自动进样器,Empower工作站,三聚氰胺(99.9%)。

1.2 色谱条件

色谱柱为Welch Materials AQ-C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm i.d.),柱温为40℃,流速为1.0 mL/min,流动相为庚烷磺酸钠(浓度为0.01 mol/L),柠檬酸(0.01 mol/L)-乙腈(90+10,体积比),检测波长为240nm,柱温为40℃,进样量20 μL。

1.3 方法(参照GB/T22388-2008)

(1)提取。准确称取2.0 g样品于50 mL的具塞塑料离心管中,加入15 mL三氯乙酸溶液和5 mL乙腈,超声提取10 min,再振荡提取10 min后,以不低于4 000 r/min离心10 min。上清液经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后,用三氯乙酸定容至25 mL,移取5 mL滤液,加入5 mL水混匀后做待净化液。

(2)净化。将待净化液转移至固相萃取柱中。依次用3 mL水、3 mL甲醇洗涤,抽至近干后,用6 mL氨化甲

醇液溶液洗脱。洗脱液于50℃下氮气吹至近干,准确加入1 mL流动相,在快速混匀器上混匀1 min,经0.45 μm的滤膜过滤,上机分析。

2 结果与讨论

2.1 数学模型

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

式中: X 为样品中三聚氰胺质量分数,mg/kg; c 为标准曲线得出试样中三聚氰胺的质量浓度,mg/L; m 为样品的质量, g; V 为样品稀释体积, mL; f_{rec} 回收率校正因子,等于回收率的倒数。

2.2 不确定度的主要分量^[7-10]

(1)标准曲线得出试样中三聚氰胺的浓度引入的不确定度 $u_{rel}(c)$:标准物质引入的不确定度、标准工作液配制过程玻璃仪器校准产生的不确定度、标准工作液配制过程温度变化产生的不确定度和标准曲线拟合的不确定度。

(2)样品称量引入的不确定度 $u_{rel}(m)$:由天平的最大允许误差引起。

(3)体积引入的不确定度 $u_{rel}(V)$:由定容体积和进样体积的不确定度组成。

(4)样品处理过程引入的不确定度 $u_{rel}(f_{rel})$:测试样品的制备过程非常复杂,需经过均质、溶液转移、过滤、固相萃取等步骤,每一步操作都会引入不确定度,要逐步确定每一步骤对测量结果不确定度的贡献是相当困难的,可采用检测方法确认中的有关数据,如回收率对制样过程引入的不确定度进行评定。

2.3 不确定度 $u_{rel}(c)$

2.3.1 标准物质引入的不确定度

根据标准物质证书提供的信息,三聚氰胺的不确定度为0.5%,按正态分布考虑,包含因子 $K=3$,属B类评定,故其相对标准不确定度为

$$u_{rel} = 0.5\%/3 = 1.67 \times 10^{-3}$$

2.3.2 配制过程中产生的不确定度评定

标准储备液的配制过程:精确称取0.1000 g三聚氰胺标准物质,加甲醇水溶液溶解并定容至100 mL,质量浓度为1.0 g/L。

(1)标准物质称量引入的不确定度。

查称量使用的Sartorius CP225D 电子天平检定证书,其最大允许误差0.05 mg,重复性误差0.02 mg,该天平属于一级天平,一般采用矩形分布,包含因子为 $\sqrt{3}$,属B类评定。其标准不确定度为

$$u_1 = a/k = 0.05\text{mg}/\sqrt{3} = 2.89 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

$$u_2 = a/k = 0.02\text{mg}/\sqrt{3} = 1.15 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

$$u_3 = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 3.11 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

相对标准不确定度为

$$u_{2rel} = 3.11 \times 10^{-2} / 100 = 3.11 \times 10^{-4}$$

(2)玻璃量具引入的不确定度。

标准工作液配制过程中使用了一系列玻璃量具,

按照《常用玻璃量具检定规程JJG196-2006》的要求,均有相应的最大允差。欧洲分析化学中心(EU-RACHEM)认为其服从三角分布,故 $K=\sqrt{6}$,由此估算不确定度分量。表1为玻璃量具校准的不确定度。

表1 玻璃量具校准的不确定度

	最大允许误差	不确定度	相对不确定度
1 mL分度吸量管A级	±0.008	0.00327	$u_4 = 3.27 \times 10^{-3}$
2 mL分度吸量管A级	±0.012	0.00490	$u_5 = 2.45 \times 10^{-3}$
5 mL分度吸量管A级	±0.025	0.0102	$u_6 = 2.04 \times 10^{-3}$
10 mL分度吸量管A级	±0.05	0.0204	$u_7 = 2.04 \times 10^{-3}$
100 mL单标线容量瓶A级	±0.10	0.0408	$u_8 = 4.08 \times 10^{-4}$

由表1中数据合成的相对不确定度为

$$u_{3rel} = \sqrt{u_4^2 + u_5^2 + u_6^2 + u_7^2 + u_8^2} = 5.02 \times 10^{-3}$$

(3)温度变化产生的不确定度评定。

温度波动产生不确定度: $T_{校正} = 20^\circ\text{C}$,而实验室的温度在 $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ 变动,该影响引起的不确定度可通过估算温度范围和体积膨胀系数来进行计算,溶剂以水为代表,水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$,玻璃的膨胀系数为 $9.75 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ (可忽略不计)。计算标准不确定度时假设温度变化是矩形分布。

表2 温度变化的不确定度

	计算结果	不确定度	相对不确定度
1 mL分度吸量管A级	$1 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.000364	$u_9 = 3.64 \times 10^{-4}$
2 mL分度吸量管A级	$2 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.000728	$u_{10} = 3.64 \times 10^{-4}$
5 mL分度吸量管A级	$5 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.00182	$u_{11} = 3.64 \times 10^{-4}$
50 mL分度吸量管A级	$50 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.0182	$u_{12} = 3.64 \times 10^{-4}$
100 mL分度容量瓶A级	$100 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3}$	0.0364	$u_{13} = 3.64 \times 10^{-4}$

由表2中数据合成的相对不确定度为

$$u_{4rel} = \sqrt{u_9^2 + u_{10}^2 + u_{11}^2 + u_{12}^2 + u_{13}^2} = 8.14 \times 10^{-4}$$

2.3.3 标准曲线拟合产生的不确定度评定 $u_{rel}(x_{fit})$

配制质量浓度为0.5, 0.8, 1, 2, 5 mg/L的标准使用溶液,每个质量浓度测量6次。

表3 标准溶液测量结果

标准溶液质量浓度/(mg·L ⁻¹)	平均峰面积/(μV·s)	峰面积计算值/(μV·s)
0.5	235 152	236 770
0.8	366 342	376 870
1	471 258	470 270
2	940 872	937 270
5	2 338 962	2 338 070

标准曲线的回归方程为 $y = 4.67 \times 10^5 x + 3.27 \times 10^3$,相关系数为0.9999。

以某品牌奶粉样品为例,6次测定后,由线性方程得到 $\bar{c} = 1.18 \text{ mg/L}$,则由拟合曲线求 x 时产生的标准不确定度为

$$u_{rel}(x_{fit}) = \frac{S_R}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{c} - \bar{c}_0)^2}{\sum_{i=1}^n (\bar{c}_i - \bar{c}_0)^2}}$$

式中: S_R 为从标准曲线求得的 Y 与相应测得值 Y_i 之差按贝塞尔公式求出的标准偏差; m 为样品溶液的测定总次数, $m=6$; n 为标准溶液的测定总次数, $n=6$; \bar{c} 为样品中三聚氰胺质量浓度的平均值; \bar{c}_0 为标准溶液中三聚氰胺质量浓度的平均值; c 为标准溶液中三聚氰胺的质量浓度。

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}$$

$$= \sqrt{\frac{(235152-236770)^2 + (366342-376870)^2 + \dots + (2338962-2338070)^2}{5-2}} \quad (n'=5),$$

$$= 6.54 \times 10^3$$

$$u_{rel}(x_{\text{曲}}) = \frac{6.54 \times 10^3}{4.67 \times 10^5} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{6} + \frac{(1.18-1.86)^2}{13.70}}$$

$$= 8.48 \times 10^{-3}$$

由标准物质、玻璃量具校准和温度变化的标准不确定度分量及标准曲线拟合产生的不确定度分量合成标准曲线得出试样中三聚氰胺的浓度的相对标准不确定度为

$$u_{rel}(c) = \sqrt{u_{1,rel}^2 + u_{2,rel}^2 + u_{3,rel}^2 + u_{4,rel}^2 + u_{5,rel}^2} = 1.00 \times 10^{-2}$$

2.4 样品称量的不确定度评定

用Mettler AL204天平(检定证书给出最大允许误差0.5 mg, 重复性误差0.3 mg)准确称取样品2 g, 由称量产生的不确定度按矩形分布考虑, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 属B类评定。其标准不确定度为

$$u_{14} = \frac{a}{k} = \frac{0.5 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-4} \text{ g}$$

$$u_{15} = \frac{a}{k} = \frac{0.3 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 1.73 \times 10^{-4} \text{ g}$$

$$u_{16} = \sqrt{u_{14}^2 + u_{15}^2} = 3.37 \times 10^{-4} \text{ g}$$

相对标准不确定度为

$$u_{rel}(m) = \frac{3.37 \times 10^{-4}}{2} = 1.68 \times 10^{-4}$$

2.5 样品定容的不确定度评定

2.5.1 体积的不确定度评定

(1) 样品定容过程中使用了一系列玻璃量具。1 mL单标线吸量管、5 mL单标线吸量管、25 mL容量瓶的最允许误差分别为 ± 0.007 , 0.015 , ± 0.03 mL。评定方法同2.3.2(2), 可得定容体积 $V_{1\text{mL单标线吸量管}}$ 、 $V_{5\text{mL单标线吸量管}}$ 、 $V_{25\text{mL容量瓶}}$ 的相对不确定度 u_{17} 、 u_{18} 、 u_{19} 分别为 2.85×10^{-3} 、 1.22×10^{-3} 、 4.90×10^{-4} 。则合成的相对不确定度为

$$u_{20,rel} = \sqrt{u_{17}^2 + u_{18}^2 + u_{19}^2} = 3.14 \times 10^{-3}$$

(2) 样品定容过程中温度变化产生的不确定度评定方法同3.1.2.3。可得 $V_{1\text{mL单标线吸量管}}$ 、 $V_{5\text{mL单标线吸量管}}$ 、 $V_{25\text{mL容量瓶}}$ 的相对不确定度 u_{20} 、 u_{21} 、 u_{22} 分别为 3.64×10^{-4} 、 3.64×10^{-4} 、 3.64×10^{-4} 。则合成的相对不确定度为

$$u_{21,rel} = \sqrt{u_{20}^2 + u_{21}^2 + u_{22}^2} = 6.30 \times 10^{-4}$$

(3) 由于实验过程中采用waters 717plus高精度自动进样器, 由进样体积引入的不确定度可忽略不计。则样品定容中的总体积 V 的标准不确定度合成为

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{20,rel}^2 + u_{21,rel}^2} = 3.20 \times 10^{-3}$$

2.6 样品处理过程产生的不确定度评定(属A类不确定度)

制样过程产生的不确定度采用添加2.5 mg/kg(与所测定样品浓度水平相近)6次样品回收率的相关数据进行计算。6次回收率测定结果为90.9%, 92.4%, 91.1%, 92.5%, 89.6%, 92.6%, 平均回收率为 $\bar{f}_{rec} = 91.5\%$, 标准偏差为 $S_{f_{rec}} = 1.20\%$, 标准不确定度采用平均值的标准偏差, 标准不确定度和相对标准不确定度分别为

$$u(\bar{f}_{rec}) = \frac{S_{f_{rec}}}{\sqrt{n}} = \frac{1.20\%}{\sqrt{6}} = 4.90 \times 10^{-3}$$

$$u_{rel}(\bar{f}_{rec}) = \frac{u(\bar{f}_{rec})}{\bar{f}_{rec}} = 5.36 \times 10^{-3}$$

同时, 必须对平均回收率进行显著性检验, 以确定回收率校正因子 f_{rec} 是否在计算公式中采用。显著性检验采用t检验(见表4)。

表4 t-检验规则

t	统计决断规则
$t < 1.96$	无显著差异
$t: [1.96, 2.58]$	有显著差异
$t > 2.58$	有非常显著差异

$$t = \frac{|100\% - \bar{f}_{rec}|}{u_{rel}(\bar{f}_{rec})} = \frac{|100\% - 91.5\%|}{5.36 \times 10^{-3}} = 15.9$$

式中, $t > 2.58$, 说明 f_{rec} 与100%有非常显著差异, 必须在计算公式中采用 f_{rec} 修正结果。

2.7 合成标准不确定度

因为根据文中给出的数学模型, 各分量无相关性。因此, 将以上各相对不确定度分量合成为

$$\left[\frac{u_{rel}(X)}{X} \right]^2 = \left[\frac{u_{rel}(c)}{c} \right]^2 + \left[\frac{u_{rel}(m)}{m} \right]^2 + \left[\frac{u_{rel}(V)}{V} \right]^2 + \left[\frac{u_{rel}(f_{rec})}{f_{rec}} \right]^2$$

$$\frac{u_{rel}(X)}{X} = \sqrt{\left[\frac{u_{rel}(c)}{c} \right]^2 + \left[\frac{u_{rel}(m)}{m} \right]^2 + \left[\frac{u_{rel}(V)}{V} \right]^2 + \left[\frac{u_{rel}(f_{rec})}{f_{rec}} \right]^2}$$

由实验数据的平均值计算得试样中三聚氰胺质量分数为 $X = 2.70 \text{ mg/kg}$,

$$u_{rel}(X) = 2.70 \sqrt{1.00 \times 10^{-2} + 1.68 \times 10^{-4} + 3.20 \times 10^{-3} + 5.36 \times 10^{-3}}$$

$$= 0.0318 \text{ mg/kg}$$

2.8 扩展标准不确定度

按国际惯例, 取包含因子 $k=2$, 被测量之值的大约95%可望含于此区间, 则扩展标准不确定度为

$$U = u_{rel}(X)k = 0.0318 \times 2 = 0.0636 \text{ mg/kg} \approx 0.064 \text{ mg/kg}$$

2.9 测量不确定度报告

按照GB/T22388-2008实验室方法《原料乳与乳制品中三聚氰胺的检测方法》测定奶粉中三聚氰胺质量分数结果为

$$c = (2.70 \pm 0.064) \text{ mg/kg}, k=2$$

3 结论

综上所述, 最终结果的不确定度主要由标准曲线拟合产生的不确定度、标准溶液配制的不确定度和试

样处理过程产生的不确定度所引起,其次是标准溶液和样品溶液的测定所引起的不确定度以及量具所引起的不确定度,由样品称量的不确定度极小,可忽略不计。

在实验中,在样品处理过程中更加规范实验操作来增大回收率、同时增加测定次数和选用更高精度的量具,则可以将结果的不确定度进一步减小。

参考文献:

- [1] 王箴. 化工辞典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
 - [2] 汪辉, 彭新凯, 李文丽. 等. 高效液相色谱测定生鲜乳及乳制品中三聚氰胺的方法研究[J]. 食品科学, 2009, 29(10): 531-535.
 - [3] 丁涛, 徐锦忠, 李健忠, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法及高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定植物源性蛋白中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(1): 6-9.
 - [4] 王征. GC-MS法测定动物食品中的三聚氰胺[J]. 福建分析测试, 2008, 17(2): 1-4.
 - [5] 蒋晨阳, 范倩, 林德情, 等. 气质联用法测定饲料中的三聚氰胺[J]. 饲料工业, 2009, 29(8): 48-50.
 - [6] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示[M]. 北京, 中国计量出版社, 1999.
 - [7] 汪辉, 曹小彦, 彭新凯, 等. 高效液相色谱法测定小麦粉与大米粉中甲醛次硫酸氢钠含量的不确定度评定[J]. 食品科学, 2009, 30(12): 205-208.
 - [8] 屈颖. 布洛芬缓释胶囊中布洛芬含量的测量不确定度评估[J]. 天津药学, 2008, 20(1): 8-10.
 - [9] 梁定鸿, 吕惠燕, 叶惠黎. 氢化物发生-原子荧光光谱法测定水中汞的测量不确定度分析[J]. 理化检验-化学分册, 2007, 43(2): 144-152.
 - [10] 何红梅, 陈祖杰, 汪辉, 等. 旋光法测定味精中谷氨酸钠含量的不确定度评定[J]. 中国计量, 2009, 5: 85-86.
-
- [3] SINGH H, NEWSTEAD D F. Aspects of Proteins in Milk Powder Manufacture[J]. Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins, 1992: 735-765.
 - [4] HILLIER R M, LYSTER R L J, CHEESEMAN G C. Thermal Denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in Cheese Whey: Effect of Total Solids Concentration and Ph [J]. Journal of Dairy Research, 1979: 103 - 111.
 - [5] MANJI B, KAKUDA Y. Thermal Denaturation of Whey Proteins in Skim Milk [J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1986, 19: 161 - 166.
 - [6] DANNENBERG F, KESSLER H G. Reaction Kinetics of the Denaturation of Whey Proteins in Milk [J]. Journal of Food Science, 1988, 53: 258 - 263.
 - [7] CORREDIG M, DALGLEISH D G. The Binding of α -lactalbumin and β -lactoglobulin to Casein Micelles in Milk Treated by Different Heating Systems[J]. Milchwissenschaft, 1996, 51: 123 - 127.
 - [8] OLDFIELD D J, SINGH H, TAYLOR M W, et al. Kinetics of Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Skim Milk Heated in an Ultra-High Temperature (UHT) Pilot Plant [J]. International Dairy Journal, 1998, 8: 311 - 318.
 - [9] SINGH H, CREAMER L K. Denaturation, Aggregation and Heat Stability of Milk Protein During the Manufacture of Skim Powder[J]. Journal of Dairy Research, 1991, 58: 269 - 283.
 - [10] ANEMA S G, LI Y. Further Studies on the Heat-induced, pH-dependent Dissociation of Casein from the Micelles in Reconstituted Skim Milk[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 2000, 33: 335 - 343.
 - [11] ANEMA S G, LI Y. Effect of pH on the Association of Denatured Whey Proteins with Casein Micelles in Heated Reconstituted Skim Milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 1640 - 1646.
 - [12] VASBINDER A J, ALTING IA C, DE KRUIF K G. Quantification of Heat-induced Casein-whey Protein Interactions in Milk and Its Relation to Gelation Kinetics [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 31: 115 - 123.
 - [13] ANEMA S G, LEE S K, LOWE E K, et al. Rheological Properties of Acid Gels Prepared from Heated Ph Adjusted Skim Milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 337 - 343.
 - [14] FAMELART M H, TOMAZEWSKI J, PIOT M, et al. Comprehensive Study of Acid Gelation of Heated Milk with Model Protein Systems[J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 313-321.
 - [15] ANEMA S G, LEE S K, KLOSTERMEYER H. Effect of pH at Heat Treatment on the Hydrolysis of κ -casein and the Gelation of Skim Milk by Chymosin[J]. LWT, 2007, 40: 99 - 106;
 - [16] FAKA M, LEWIS M J, GRANDISON A S, et al. The Effect of Free Ca^{2+} on the Heat Stability and Other Characteristics of Low-heat Skim Milk Powder[J]. International Dairy Journal, doi:10.1016/j.idairyj.2009.12.6.

(上接第46页)