

无汞盐比色法测定脱皮鱿鱼丝 SO_2 的不确定度评定

竺巧玲¹, 曹建平¹, 楼乔明^{2,*}

(1. 宁波市鄞州区质量技术监督检测中心(宁波市鄞州区食品安全检测中心), 浙江宁波 315100;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要:根据 JJF 1059-1999《测量不确定度评定与表示》技术规范要求, 建立了无汞盐比色法测定脱皮鱿鱼丝中 SO_2 的测量不确定度的数学模型, 分析了不确定度的主要来源, 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。结果表明, 影响测量结果的主要因素为二氧化硫标准物质、标准曲线拟合引入的不确定度; 而样品的称重、样品的定容以及重复性实验引入的不确定度相对较小; 用该法测得脱皮鱿鱼丝中 SO_2 为 13.35mg/kg, 扩展不确定度为 0.52mg/kg (95%, $k=2$); 这可为实验室在该检测过程中进一步提高检测数据的可靠性和一致性作参考。

关键词:无汞盐比色法, SO_2 , 脱皮鱿鱼丝, 不确定度

Uncertainty evaluation for determining concentration of Sulfur Dioxide Residue in Peeled Shredded Squid by no mercury salt colorimetry

ZHU Qiao-ling¹, CAO Jian-ping¹, LOU Qiao-ming^{2,*}

(1. Ningbo Yinzhou Measurement and Test Center for Quality and Technique Supervising, Ningbo (Food safety Testing Center of Yinzhou District), 315100, China; 2. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: According to evaluation and expression of Uncertainty in Measurement (JJF1059-1999). A mathematical model was established to assess the uncertainty for determining the concentration of Sulfur Dioxide Residue in Peeled Shredded Squid by no mercury salt colorimetry. Various sources of uncertainty were assessed. The influence of the identified uncertainty of the analytical result was evaluated. The results showed that the key factors of uncertainty were Sulfur dioxide standard substance and the fitting of calibration curve thirdly. Sample weighting, voluming and repeated experiment were subordinate factors of uncertainty. The concentration of lead was 13.35mg/kg and the expanded uncertainty was 0.52mg/kg (95%, $k=2$). It can be used as a reference for the laboratory in the detection process to further improve the reliability of the test data and consistency.

Key words: no mercury salt colorimetry; Sulfur Dioxide Residue; Peeled Shredded Squid; Uncertainty

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)23-0295-04

基于检测技术发展水平, 检测手段和检测设备的局限, 一切测量结果都不可避免地具有不确定度, 不确定度是表征合理地赋予被测量值的分散性, 与测量结果相联系的参数, 它可以给出测量结果的可信程度, 是对测量结果质量的定量评定^[1]。通过对测量数据进行不确定度分析, 可找出影响不确定度的因素, 对不确定度进行评估, 给出不确定度, 能如实反映测量的置信度和准确性, 为评价测量结果提供科学依据。目前, 不确定度广泛应用于检测实验室和计量机构中, 随着社会对食品安全的关注度不断提高, 不确定度在食品检测实验室的质量管理和质

量保证中也显得更为重要。目前, 国标法测定 SO_2 采用 GB/T 5009.34-2003《食品中亚硫酸盐的测定》方法^[2], 其中第一法盐酸副玫瑰苯胺法, 此法使用四氯汞钠作为二氧化硫的吸收液, 其中使用到大量的剧毒试剂氯化汞。氯化汞严重影响到化验人员的身体健康, 同时对环境也造成极大的污染, 愈来愈受到人们的质疑; 第二法为蒸馏法, 虽然精密度与准确度较好, 可是蒸馏一个样品需要半个小时, 且处理样品能力很小, 这两种方法均存在一定的缺陷, 因此研究一种无汞且简单方便的 SO_2 检测方法势在必行。目前, 已有不少关于无汞盐比色法测定食品中 SO_2 的报道^[3-14], 因此本文在前人研究的基础上, 以宁波市较常见的食品——脱皮鱿鱼丝为例, 采用无汞盐比色法测定脱皮鱿鱼丝中的 SO_2 , 分析测量结果的不确定度来源并定量, 对测量结果进行不确定度评定, 了解被检测指标真值所处范围及大小, 同时也为使用

收稿日期: 2013-03-11

作者简介: 竺巧玲 (1983-), 女, 硕士, 质量工程师, 研究方向: 食品质量管理 and 检测工作。

表1 100mL容量瓶和5mL吸管的不确定度

Table 1 The uncertainty of 100mL volumetric flask and 5mL pipet

项目	校准		重复性标准 不确定度 (mL)	温度		合成标准 不确定度 (mL)	相对 不确定度
	20℃时容量 允差(mL)	校准标准 不确定度(mL)		体积差 (mL)	温度标准不确 定度(mL)		
100mL容量瓶	0.10	0.058	0.081	0.10	0.0525	0.113	0.00113
5mL吸管	0.015	0.0087	0.011	0.0052	0.0030	0.014	0.0029

此法代替四氯汞钠吸收的方法提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

二氧化硫标准溶液 环境保护部标准样品研究所,浓度值 100μg/mL;移液管和容量瓶均为 A 级;脱皮鱿鱼丝样品 市售。

紫外可见分光光度计 美国 PerkinElmer 公司。

1.2 样品处理

称取 10.0000g 脱皮鱿鱼丝,样品粉碎后,加少量水,置于 100mL 容量瓶中,浸泡 1h,加入 4mL 氢氧化钠溶液(0.5mol/L),混匀,5min 后加入 4mL 硫酸(0.25mol/L),然后加入 20mL 甲醛吸收工作液,用水稀释至刻度,混匀。吸取 5mL 样液,用甲醛吸收工作液定容至 10mL,再加入 1mL 氨基磺酸钠溶液、0.5mL 氢氧化钠溶液(2mol/L)和 1mL 盐酸副玫瑰苯胺溶液,充分混匀后,室温下静置 20min。用 1cm 比色皿,于波长 579nm 处测定吸光度,按标准曲线和国标方法,计算公式 $X = 2A$ (A 值由标准曲线方程计算得出)计算结果^[15]。

1.3 数学模型

二氧化硫浓度计算公式如下:

$$X = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{C_i \times V_2}{m_i \times V_1}$$

式中 X 为样品中 SO_2 (mg/kg); C_i 为第 i 份样品的样液中二氧化硫的含量(μg); m_i 为第 i 份样品质量(g); V_1 为测定用样液的体积(mL); V_2 为样品定容体积(mL)。

2 结果与讨论

2.1 不确定度分量主要来源分析及定量

由材料与方法可以看出,脱皮鱿鱼丝中二氧化硫测定的主要步骤包括样品粉碎、称重、浸泡提取、定容、测定等步骤。而将样品先粉碎后称量,可以认为样品是均匀的,由此所致的不确定度忽略不计。因此,本文主要对样品称重、样品定容、二氧化硫标准物质、标准曲线拟合以及重复性实验所引起的不确定度进行分析及定量。

2.1.1 样品的称量 所用电子天平的最大允差 ± 0.0001g,按 B 类不确定度评定,可认为服从均匀分布,标准不确定度为:

$$u(m) = \frac{0.0001}{\sqrt{3}} = 0.000058\text{g}$$

样品的称样量为 10.0000g,则相对标准不确定度为:

$$\frac{u(m)}{m} = \frac{0.000058}{10.0000} = 0.0000058$$

2.1.2 样品的定容 样品浸泡提取后,稀释定容到 100mL,此 100mL 容量瓶的标准不确定度来源包括:

2.1.2.1 容量瓶的校准 经计量检定,100mL A 级容量瓶容量允差为 ± 0.1mL,按 B 类不确定度评定,用均匀分布换算成标准不确定度为:

$$u_1(V_{100}) = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.058\text{mL}$$

2.1.2.2 容量瓶的重复性 用 100mL A 级容量瓶重复进行 20 次定容和称量,实验得出测定结果的标准偏差为 0.081mL,按 A 类不确定度评定,则充满液体至刻度的准确性引起的标准不确定度为:

$$u_2(V_{100}) = 0.081\text{mL}$$

2.1.2.3 温度 容量瓶是在 20℃ 下校准,假设温度在 (20 ± 5)℃ 之间变动,水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$,玻璃的膨胀系数忽略不计,按 B 类不确定度评定,可以认为服从均匀分布,在 95% 置信概率下,按正态分布计算,则由温度引起的标准不确定度为:

$$u_3(V_{100}) = \frac{\Delta V_{100}}{2} = \frac{100.0 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4}}{2} = 0.0525\text{mL}$$

合成以上三项得出

$$u(V_{100}) = \sqrt{u_1(V_{100})^2 + u_2(V_{100})^2 + u_3(V_{100})^2} = 0.113\text{mL}$$

则样品定容的相对不确定度为:

$$\frac{u(V_{100})}{V_{100}} = \frac{0.113}{100.0} = 0.00113$$

2.1.3 标准物质的不确定度

2.1.3.1 标准储备液的不确定度 二氧化硫标准溶液由环境保护部标准样品研究所购置,证书上给出的扩展不确定度($k=2$)为 2μg/mL,则二氧化硫标准储备液的标准不确定度为:

$$u(C_{\text{标}}) = \frac{2}{2} = 1\mu\text{g/mL}$$

储备液的相对不确定度为:

$$\frac{u(C_{\text{标}})}{C_{\text{标}}} = \frac{1}{100} = 0.01$$

2.1.3.2 稀释引入的不确定度 将 100μg/mL 标准贮备液按 1:20 稀释一次,得到 5μg/mL 二氧化硫标准使用液。稀释过程采用 5mL 吸管和 100mL 容量瓶完成,其不确定度均从校准、重复性和温度三个方面来评定,结果列于表 1 中。

合成以上几项不确定度分量,则由标准物质引入的不确定度为

$$\frac{u(C_{\text{std}})}{C_{\text{std}}} = \sqrt{\left(\frac{u(C_{\text{标}})}{C_{\text{标}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{100})}{V_{100}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_5)}{V_5}\right)^2} = 0.0105$$

2.1.4 标准曲线拟合的不确定度 用 5 μg/mL 二氧化硫标准使用液, 分别对空白溶液及 5 种浓度的二氧化硫标准溶液进行 2 次重复测定, 测定结果见表 2。

表 2 标准曲线测定结果
Table 2 The results of calibration curve

SO ₂ 的含量 (μg/mL)	吸光度	平均吸光值 A
0	0.000	0.000
5.0	0.079	0.077
10.0	0.146	0.150
15.0	0.217	0.219
25.0	0.360	0.356
50.0	0.709	0.707

标准曲线方程:
 $A = a + bC = 0.0052 + 0.0141C \quad R^2 = 0.9999$
 根据标准溶液的质量浓度利用标准曲线求得吸光度的理论值 $a + bC_i$, 计算实际吸光度 A_i 与理论值的残差 (n 为标准溶液测定总次数, $n = 12$), 则按贝赛尔公式计算求得的残差标准偏差:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (a + bC_i)]^2}{n-2}} = 0.00260$$

离均差和为:
 $l_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2 = 3243$
 其中 $\bar{C}$ 为 6 个标准浓度的平均值。
 p 为样品测定次数, 实际测量 6 次, 则 $p = 6$, 测得容量瓶中二氧化硫的浓度 C_s 为 6.7 μg/L。则标准曲线拟合的标准不确定度为:

$$u(C_{sp}) = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_s - \bar{C})^2}{l_{xx}}} = 0.099 \mu\text{g/mL}$$

标准曲线拟合的相对不确定度为:
 $\frac{u(C_{sp})}{C_{sp}} = \frac{0.099}{6.7} = 0.0148$

2.1.5 重复性实验引入的不确定度 6 次重复测定的结果, 覆盖实验的全过程, 即始于取样、样品浸泡直至检测和计算结果。结果见表 3。

表 3 样品二氧化硫重复测定结果
Table 3 The results of sample

编号	吸光度	测定结果 (mg/kg)
1	0.098	13.2
2	0.100	13.4
3	0.100	13.4
4	0.098	13.2
5	0.102	13.7
6	0.098	13.2
平均值	0.099	13.35

按 A 类不确定度考虑: 亚硫酸盐含量的标准差为

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.197$$

则测量重复性 A 类不确定度为

$$u(A) = \frac{0.197}{\sqrt{6}} = 0.0804 \text{ mL}$$

测量重复性 A 类相对不确定度为

$$u_{rel}(A) = \frac{u(A)}{\bar{X}} = 0.00602$$

2.2 相对合成标准不确定度

样品中 SO₂ 的标准不确定度分析: 测得样品中 SO₂ 为 13.35 mg/kg, 则样品中 SO₂ 的标准不确定度为:

$$\frac{u_c(X)}{X} = \left\{ \left[\frac{u(m)}{m} \right]^2 + \left[\frac{u(V_{100})}{V_{100}} \right]^2 + \left[\frac{u(C_{std})}{C_{std}} \right]^2 + \left[\frac{u(C_{sp})}{C_{sp}} \right]^2 + \left[\frac{u(A)}{\bar{X}} \right]^2 \right\}^{-1} = 0.0192$$

则 SO₂ 的相对合成标准不确定度为:

$$u_c(X) = 0.0192X = 0.0192 \times 13.35 = 0.26 \text{ mg/kg}$$

2.3 扩展不确定度的评定

取包含因子 $k = 2$ (95% 的置信概率), 则
 $U(X) = 2u_c(X) = 0.26 \times 2 = 0.52 \text{ mg/kg}$

测量结果可表示为:

$$X = (13.35 \pm 0.52) \text{ mg/kg}, k = 2$$

3 结论

从评定结果可以看出, 无汞盐比色法测定脱皮鲑鱼丝中 SO₂ 为 13.35 mg/kg, 扩展不确定度为 0.52 mg/kg, 本实验测得脱皮鲑鱼丝中 SO₂ 含量为 (13.35 ± 0.52) mg/kg。测量结果的不确定度主要来源于二氧化硫标准物质、标准曲线拟合; 而样品的称重、样品的定容以及重复性实验引入的不确定度相对较小。对测量结果进行不确定度分析定量, 一方面能了解被检测指标真值所处范围及其大小, 判断检测指标是否符合标准要求; 另一方面, 在实际工作中控制影响测量不确定度的主要因素, 注意二氧化硫标准物质和标准曲线拟合两个方面的影响, 以尽量减少实验带来的误差, 保证结果的准确可靠。

参考文献

[1] 国家质量技术监督局. 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.
 [2] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.34-2003 食品中亚硫酸盐的测定[S].
 [3] 吴敏, 黄诚. 无汞盐比色法测定白砂糖中的二氧化硫[J]. 轻工科技, 2012(1): 11-12.
 [4] 李文生, 郭振忠, 冯晓元, 等. 无汞盐吸收-超声波浸提检测干果 SO₂ 残留方法的探讨[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 261-263.
 [5] 刘宏芳, 许卓望. 无汞吸收盐酸副玫瑰苯胺比色法快速测定硫磺熏蒸食品中二氧化硫[J]. 中国调味品, 2006, (5): 21-23.
 [6] 方那有, 高志贤. 食品中亚硫酸盐的三乙醇胺吸收法检测[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(2): 245.

(下转第 302 页)

样品进行了分离,最终纯化得到一种内切 β -葡聚糖酶(EndoG)。经电泳方法测定,该酶分子量 23.6ku。实验结果表明,EndoG 降解热凝胶主要生成昆布二糖和昆布三糖,最适反应条件为 pH5.0,50℃。通过底物特异性及水解产物分析,表明 EndoG 属于内切 β -1,3-葡聚糖酶,分类为 EC3.2.1.39。由于 EndoG 对水不溶性底物热凝胶具有较高的水解活性,对该酶的深入研究可以为提高热凝胶利用率 and 应用范围提供帮助。

参考文献

- [1] Stanisich V A, Stone B A. Functional roles of (1,3)- β -glucans and related polysaccharides: prokaryotes. In: Bacic A, et al. Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides [M]. Boston: Academic Press, 2009: 327-352.
- [2] Myklestad S, Granum E. Biology of (1,3)- β -glucans and related glucans in protozoans and chromistans. In: Bacic A, et al. Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides [M]. Boston: Academic Press, 2009: 353-385.
- [3] Clavaud C, Aïmanianda V, Latge J P. Organization of fungal, oomycete and lichen (1,3)- β -glucans. In: Bacic A, et al. Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides [M]. Boston: Academic Press, 2009: 387-424.
- [4] Duan F, Lu X. Enzymatic properties and kinetics of an endo- β -1,3-glucanase of *Mitsuaria chitosanitabida* H12 and preparation of 1,3- β -D-glucooligosaccharides from yeast β -glucan[J]. Annals of microbiology, 2012, 62(1): 307-312.
- [5] Borjihan G, Zhong G, Baigude H, et al. Synthesis and anti-HIV activity of 6-amino-6-deoxy-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-curdlan sulfate[J]. Polymers for Advanced Technologies, 2003, 14(3-5): 326-329.
- [6] Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, et al. Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco[J]. Plant Physiology, 2000, 124(3): 1027-1038.
- [7] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic acids research, 2009, 37(11): D233-D238.
- [8] Ueda M, Yamaki K, Goto T, et al. Purification and characterization of 1,3- β -D-glucanase from *Eisenia foetida*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(1): 271-276.
- [9] Hong T Y, Cheng C W, Huang J W, et al. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- β -glucan[J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1151-1159.
- [10] Yu L, Wu J, Liu J, et al. Enhanced curd production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 by addition of low-polyphosphates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 16(1): 34-41.
- [11] Sakamoto Y, Nakade K, Konno N. Endo- β -1,3-glucanase GLU1, from the fruiting body of *Lentinula edodes*, belongs to a new glycoside hydrolase family[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8350-8354.
- [12] Nobe R, Sakakibara Y, Fukuda N, et al. Purification and characterization of laminaran hydrolases from *Trichoderma viride*[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2003, 67(6): 1349-1357.
- [13] Tanabe Y, Oda M. Molecular characterization of endo-1,3- β -glucanase from *Cellulosimicrobium cellulans*: Effects of carbohydrate-binding module on enzymatic function and stability[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2011, 1814(12): 1713-1719.
- [14] Cota J, Alvarez T M, Citadini A P, et al. Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo- β -1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 406(4): 590-594.
- [15] Kikuchi T, Shibuya H, Jones J T. Molecular and biochemical characterization of an endo- β -1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria[J]. Biochemical Journal, 2005, 389(Pt 1): 117-125.
- [16] Zakharenko A M, Kusaykin M I, Kovalchuk S N, et al. Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis*[J]. Carbohydrate research, 2011, 346(2): 243-252.
- (上接第 297 页)
- [7] 唐玉芳, 梁漪莲. 汞吸收法测定白糖中亚硫酸盐[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 270-272.
- [8] 杨文英, 王芳. 甲醛吸收-盐酸副玫瑰苯胺法测定食品中的亚硫酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 400-402.
- [9] 戎江瑞, 俞安复, 张立军, 等. 汞吸收液测定食品中亚硫酸盐方法探讨[J]. 现代预防医学, 2007, 34(7): 1342-1344.
- [10] 余娟, 卢家炯, 郭剑雄. 三乙醇胺吸收-盐酸副玫瑰苯胺分光光度法测定白砂糖中的二氧化硫[J]. 甘蔗糖业, 2009(1): 41-45.
- [11] 滕金兰, 宁方尧. 白砂糖中二氧化硫测定结果的不确定度分析[J]. 广西轻工业, 2009(2): 5-6, 17.
- [12] 王玫. 甲醛吸收-盐酸副玫瑰苯胺分光光度法测定污染源中二氧化硫的改进[J]. 福建分析测试, 2011(2): 34-36.
- [13] 张伟. 甲醛缓冲溶液吸收-盐酸副玫瑰苯胺分光光度法测定空气中二氧化硫几点探讨[J]. 科技与企业, 2012(8): 326.
- [14] 顾海峰. 甲醛吸收-副玫瑰苯胺分光光度法测定环境空气中的二氧化硫[J]. 轻工科技, 2012(6): 128-129.
- [15] 余娟. 白砂糖中二氧化硫测定方法的分析及探讨[D]. 南宁: 广西大学, 2007.