

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.01.014

文章编号:2095-6002(2019)01-0090-08

引用格式:袁磊,李涛,林芳,等. 固体复合香辛料中罂粟壳质控样的制备[J]. 食品科学技术学报,2019,37(1):90-97.



YUAN Lei, LI Tao, LIN Fang, et al. Preparation of quality control sample for poppy shell in solid compound spice[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(1):90-97.

固体复合香辛料中罂粟壳质控样的制备

袁磊, 李涛, 林芳, 王一欣, 裴小龙

(陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:建立了一种固体复合香辛料中罂粟壳质控样制备方法。将香辛料基质材料与罂粟壳各自经微波干燥、混合、粉碎和过筛,后经一次混合、加抗结剂、二次干燥、二次过筛和二次混合后,制得200份质控样本。经均匀性与稳定性检验后,由10家实验室采用液相色谱-串联质谱法对样本进行协同定值,并进行不确定度评估。结果表明:样本中5种生物碱类物质的特性值分别为可待因(907 ± 20.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$,蒂巴因(918 ± 18.4) $\mu\text{g}/\text{kg}$,吗啡(315 ± 16.5) $\mu\text{g}/\text{kg}$,罂粟碱(171 ± 12.6) $\mu\text{g}/\text{kg}$,那可丁(139 ± 15.8) $\mu\text{g}/\text{kg}$,均匀性与稳定性良好,适用于复合香辛料中生物碱类物质检测过程的方法验证与质量控制。

关键词:罂粟壳;复合香辛料;质控样;制备方法;质量控制

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

随着人们生活水平的提高,简单的调味料已不能满足人们的生活需求,复合香辛料在食品中的应用越来越广泛,由于它是由多种香辛料构成^[1],使用方便,且在应用时都有固定的配方,具有定量的可操作性,对于餐饮的规模化生产,特别在烹饪加工中菜品的质量稳定与标准化具有重要意义^[2]。然而不法分子为了谋取利益,提高食品的口感,将罂粟壳或其浸提物添加到香辛料、调味料、火锅料中使食物味道鲜美,罂粟壳含多种生物碱类物质,如吗啡、可待因、那可丁、罂粟碱、蒂巴因等,长期食用易使人体产生依赖性而造成瘾癖,导致慢性中毒,出现发冷、出虚汗、乏力、面黄肌瘦、犯困等症状,严重时可能对神经系统、消化系统造成损害,引起精神失常,出现幻觉,有时甚至会导致呼吸停止而死亡^[3-6]。截至目前,卫计委先后公布了6批食品非法添加物质目录,罂粟壳被列入了第一批食品非法添加物质目录中^[7]。

目前检测香辛料中罂粟壳生物碱类物质的方法有液相色谱法^[8]、液相色谱-串联质谱法^[9-11]、气相色谱-质谱法^[12-13]、荧光定量PCR法^[14],国家标准方法有DB31 2010—2012《食品安全地方标准 火锅食品中罂粟碱、吗啡、那可丁、可待因和蒂巴因的测定 液相色谱-串联质谱法》,对罂粟壳生物碱类物质快速检测方法(胶体金法、电子鼻技术)也有相关应用^[15-16],然而在对生物碱类物质的检测过程中,基体的干扰使得在分析检测时不能简单地采用纯品标准物质来检测校准或质量控制,需要一定带基体的质控样来协助检测才能保证检测结果的准确性或满足要求,目前对含有罂粟壳的香辛料质控样的制备技术或相近技术无公开文献介绍,因此制备相关质控样对于检测方法的开发、检测过程的质量控制、实验室能力验证、实验室间比对及在快速检测领域用于快检过程质量控制等具有重要意义。

收稿日期:2018-02-11

基金项目:陕西省食品药品快速检测公共服务平台建设项目(2014FWPT-01)。

第一作者:袁磊,男,助理工程师,主要从事食品安全性检测与快速检测方面的研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁、D3-吗啡、D3-可待因对照品, 中国药品生物制品检定所; 甲醇、乙腈、甲酸, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 甲酸铵, 色谱纯, 韩国 Duksan 公司; 盐酸、无水硫酸镁、无水乙酸钠, 分析纯, 国药集团; 乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)(粒度 40~70 μm)、C18 填料(粒径 40~50 μm), 天津博纳艾杰尔公司; 小茴香、八角茴香、桂皮、肉蔻、花椒、白胡椒、干姜、陈皮、丁香、孜然、甘草均为市售。

1.2 仪器与设备

AB Qtrap 5500 型液相色谱-质谱联用仪(配有电喷雾离子源及数据处理系统), 美国 SCIEX 公司; RWBx-08S 型箱式智能微波干燥机, 南京苏瑞公司; SYH-5 型三维混合仪, 常州海尧干燥设备有限公司; BJ-800A 型粉碎机, 上海拜杰公司; IS075 型直线电子加速器, 同方威视公司; LYNX4000 型离心机, 美国 Thermo 公司; KQ-500DE 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; MS3 型涡旋振荡器, 德国 IKA 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 含有罂粟壳的固体复合香辛料质控样的制备

本研究建立了一种含有罂粟壳的固体复合香辛料质控样的制备方法, 制备流程见图 1, 该方法简单, 可操作性强、质控样均匀性良好, 稳定性强, 可在常温下长期保存。

1.3.1.1 基质材料的制备

根据市售香辛料、调味料的配方, 取用新鲜干燥, 具有本身特有气味和无霉变的原料小茴香、八角茴香、桂皮、肉蔻、花椒(去籽)、白胡椒、干姜、陈皮、丁香、孜然、甘草, 除去杂质, 进行微波干燥, 干燥时微波功率 0.5 kW, 1 kg 物料干燥 5 min。干燥后按 GB 5009.3—2010《食品安全国家标准 食品中水分的测定》检测水分含量, 使干燥后的基质材料水分质量分数控制在 5% 以下。将干燥好的基质材料按一定比例混合, 根据市售香辛料、调味料的混合比例以及最大限度的覆盖所有基质材料, 调整基质材料用量及比例见表 1, 混合后粉碎, 过 40 目筛, 将制备好的基质材料按 1.3.2 节方法进行检验, 以确保其不含罂粟壳生物碱类物质(吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁)。

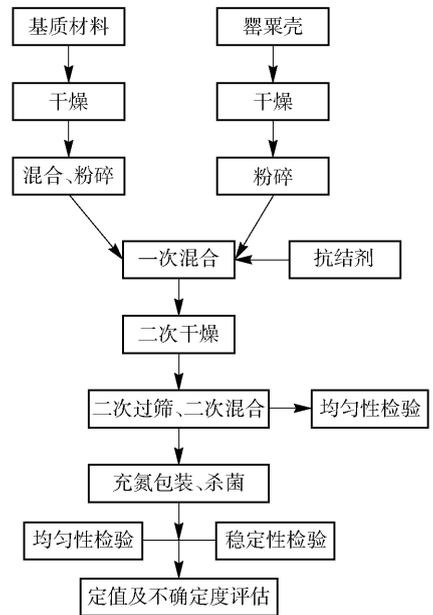


图 1 含有罂粟壳的固体复合香辛料质控样制备流程
Fig. 1 Preparation flow diagram of quality control samples of solid compound spices containing poppy shell

表 1 基质材料用量及比例

Tab. 1 Amounts and proportions of different kinds of materials

名称	<i>m</i>	名称	<i>m</i>
小茴香	200	香草	20
八角茴香	200	白胡椒	200
桂皮	300	干姜	100
肉蔻	100	陈皮	50
花椒	300	丁香	100
孜然	300	甘草	100
总计 1970			

1.3.1.2 罂粟壳的处理

取用一定量的罂粟壳, 除去杂质后进行微波干燥, 1 kg 基质材料, 微波功率 0.5 kW, 干燥时间为 5 min。使干燥后的罂粟壳水分质量分数控制在 5% 以下, 粉碎, 粉碎后过 40 目筛, 依据 1.3.2 节方法对制备好的材料进行生物碱类物质的含量检测, 检测结果为吗啡质量分数为 0.09%、可待因质量分数为 0.27%、蒂巴因质量分数为 0.27%、罂粟碱质量分数为 0.04%、那可丁质量分数为 0.03%。

1.3.1.3 一次混合

根据罂粟壳中生物碱的含量, 称量 3 g 罂粟壳粉末, 3 kg 基质材料, 将 m (基质材料) 与 m (罂粟壳

粉末)按5:1比例进行初次混合,混合均匀后的样品与基质材料 $m:m=1:10$ 的比例再次混合,混合均匀后的样品与剩余的基质材料混合,根据混合后质控样的总量按质量分数0.5%的比例加入 SiO_2 抗结剂,混合均匀。

对混合方法进行了实验研究,在混合时 m (样品)与 m (基质材料)的最大混合比例为1:10,三维混合法,40 r/min,混合2 h。

1.3.1.4 二次混合

对混合均匀的质控样进行二次干燥,使干燥后的基体粉末水分质量分数控制在5%以下,干燥后过40目筛,进行二次混合,三维混合法,40 r/min,混合2 h。

1.3.1.5 分装

西林瓶充氮包装,每瓶装10 g,共200瓶。

1.3.1.6 杀菌

采用辐照杀菌法对样品进行杀菌,杀菌条件为:辐照源 ^{60}Co ,辐照剂量7 kGy。

1.3.2 质控样中生物碱类物质的检测

1.3.2.1 样品前处理方法

按照DB 31 2010—2012方法检测生物碱类物质。采用0.1 mol/L盐酸溶液与乙腈超声提取,加入无水硫酸镁与无水醋酸钠离心分层,上清液经

PSA、无水硫酸镁、C18粉末净化后,液相色谱-串联质谱法测定,罂粟碱、那可丁、蒂巴因采用外标法定量,吗啡、可待因采用内标法定量。

1.3.2.2 液相色谱条件

Agilent ZORBAX SB - Aq(100 mm × 2.1 mm × 1.8 μm)型色谱柱,柱温35 $^{\circ}\text{C}$,流速0.2 mL/min,进样量5 μL ,流动相A为甲醇,流动相B为含体积分数为0.1%甲酸的10 mmol/L甲酸铵溶液,梯度洗脱,洗脱时间6 min,梯度洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱条件

Tab.2 Conditions of gradient elution

t/min	φ (流动相A)/%	φ (流动相B)/%
0	90	10
0.3	90	10
1.0	80	20
2.5	80	20
3.0	90	10
6.0	90	10

1.3.2.3 质谱条件

电离模式ESI $^{+}$,扫描方式MRM多反应监测,毛细管电压5 500 V,脱溶剂气温度550 $^{\circ}\text{C}$,喷雾器流速55 PSI,定性、定量离子对和碰撞电压(CE)及去簇电压(DP)见表3。

表3 生物碱类化合物的质谱参数

Tab.3 Mass spectrometry parameters of alkaloid compounds

化合物	母离子/ u	子离子/ u	U (去簇)/V	U (碰撞)/V
吗啡	286.1	181.0*, 165.2	90	35,40
可待因	300.2	215.1*, 165.2	90	35,40
蒂巴因	312.1	58.1*, 249.1	110	35,30
罂粟碱	340.2	202.1*, 171.1	90	45,40
那可丁	414.2	220.1*, 353.2	90	40,45
D3-吗啡	289.2	185.2*, 165.2	110	40,45
D3-可待因	303.2	215.2*, 165.1	110	35,45

* 为定量离子,其他为定性离子。

1.3.3 样品均匀性检验

按照GB/T 15000.5—1994对质控样进行均匀性实验,均匀性检验的总体样本数共200个,顺序编号后随机抽取15个样品进行均匀性检验,每个样品在重复条件下检测3次为一组,共15组数据,采用单因素方差分析方法对数据进行统计分析,计算组内的均方差与组间均方差,以及各自的自由度,显著性水平 α ,按方差检验给定的计算方法计算统计量

F,通过GB/T 15000.5—1994附录B,找出临界值F,进行比较,得出结论。

1.3.4 样品稳定性检验

依据GB/T 15000.3—2008,质控样在进行定值时,需考虑长期稳定性(有效期)与短期稳定性(运输条件下参考物质的稳定性),因该参考物质为常温保存,可不考虑短期稳定性,只考察长期稳定性。实验方法为在对质控样分装后2、4、6、8、10、12、14

个月考察稳定性,每个时间点随机抽取3个样品,每个样品平行测定2次,以3瓶样品的总平均值为该时间稳定性检验结果,0个月检验结果使用均匀性检验结果的总平均值;检测方法与均匀性研究检验方法一致。

数据统计方法依据 GB/T 15000.3—2008 采用线性拟合方程模型为稳定性研究基本模型,可表示为 $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$, 其中 X 为时间, Y 为参考物质的特性量值, β_0 、 β_1 为回归系数, ε 为随机误差分量。对于稳定性较好的样品, β_0 为测定得到的值, β_1 期望值为 0, X 与 Y 之间的线性关系可用 t 检验法, 具体方法如下。

直线斜率的计算式:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (1)$$

截距的计算式:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (2)$$

直线上点标准偏差的计算式:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad (3)$$

与斜率相关的不确定度的计算式:

$$S(b_1) = \frac{S}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (4)$$

1.3.5 定值与不确定性评估

质控样的定值由 10 个通过资质认定的实验室采用 DB 31 2010—2012 方法协作完成,检测数据经柯克伦检验,格拉布斯检验后取平均值进行定值。

由于本批质控样采用的定值方式是由 10 家实验室协同定值的方案,因此不确定度主要包括:短期稳定性引入的不确定度、测定值的标准不确定度、瓶间差异引入的不确定度与长期稳定性引入的不确定度。本批参考物质定值方式是协同定值,短期稳定性引入的不确定度已包含在实验室的检测值中,故可忽略不计,最终的不确定度由以上不确定度的合成不确定度表示。

2 结果与分析

2.1 辐照杀菌条件的优化

采用 ^{60}Co - γ 对包装好的质控样进行杀菌^[17-18],

取 33 份独立包装的样本,分别以 0~10 kGy 的辐照剂量进行辐照,对辐照后的样本取样进行微生物检测以评价灭菌效果,细菌总数随辐照剂量的变化趋势如图 2,由图 2 可以看出,当辐照剂量达到 6 kGy 时,菌落总数达到无检出的水平 ($< 10 \text{ CFU/g}$),因此,辐照杀菌可以实现质控样的灭菌,为保证充分灭菌,最终选择以 7 kGy 对质控样进行辐照灭菌。

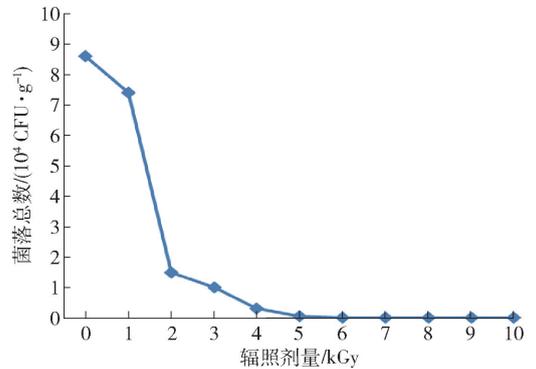


图 2 辐照对质控样中菌落总数的影响

Fig. 2 Effects of irradiation on total number of colonies in quality control samples

为验证 ^{60}Co - γ 辐照前后对质控样中生物碱类物质的影响,对辐照前后样本中的生物碱类物质进行检测,5 种生物碱类物质随辐照剂量的变化如图 3。由图 3 可知,辐照前后生物碱类物质的含量差异不明显,因此 ^{60}Co - γ 辐照可以达到灭菌的效果,有效的延长了保质期。

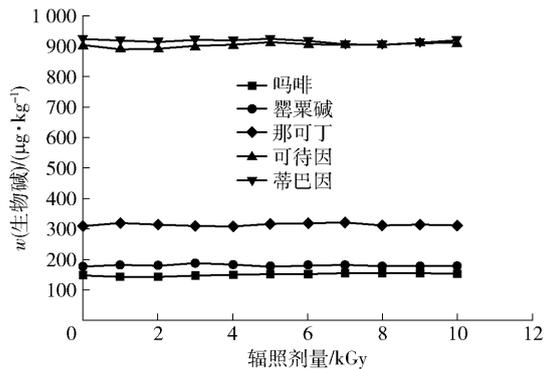


图 3 辐照对质控样中生物碱类物质的影响

Fig. 3 Effects of irradiation on alkaloids in quality control samples

2.2 样品均匀性检验

按照 DB 31 2010—2012 方法对样品进行检测,采用单因素方差分析法对数据进行统计分析,检验样品的均匀性,结果见表 4,组间自由度为 14,组内自由度为 30,查 GB/T 15000.5—1994 附录 B, $F_{0.05}$

(14,30) = 2.31, 由表可以看出5个组分的 F 值均小于 $F_{0.05}(14,30)$, 表明样品间不存在显著性差异, 证明所得的样本是均匀的。

2.3 样品稳定性检验

按照 1.3.4 的方法对检测结果进行数据统计分

析, 结果见表 5, 查 GB/T 15000.5—1994 附录 F , 得自由度为 6, 置信水平为 0.95 的 t 因子为 2.48, 由计算结果可以看出, $|b_1| < t_{0.95,6} \times S_{b_1}$, 故斜率是不显著的, 因而说明样品在 14 个月期间有良好的稳定性。

表 4 固体复合香辛料中 5 种生物碱的均匀性检验结果

Tab. 4 Uniformity results of 5 kinds of alkaloids in solid compound spices

化合物	组间标准差	组内标准差	平均值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	F 值	$F_{0.05}(14,30)$
吗啡	27	32	321	1.16	
可待因	23	45	907	1.93	
蒂巴因	21	25	922	1.15	2.31
罂粟碱	18	23	188	1.32	
那可丁	18	16	150	0.89	

表 5 固体复合香辛料质控样中 5 种生物碱的稳定性检验结果

Tab. 5 Stability results of 5 kinds of alkaloids in solid compound spices

化合物	$w(\text{生物碱类物质})/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$								b_1	S_{b_1}	$t_{0.95,6}$	$t_{0.95,6} \times S_{b_1}$
	0 个月	2 个月	4 个月	6 个月	8 个月	10 个月	12 个月	14 个月				
吗啡	321	316	320	310	314	307	319	311	0.535 7	0.570 6		1.415
可待因	907	912	903	919	894	907	911	899	0.440 5	0.726 0		1.800
蒂巴因	922	915	919	911	904	914	908	916	0.589 3	0.641 7	2.48	1.591
罂粟碱	188	179	181	177	183	189	179	177	0.279 8	0.439 0		1.089
那可丁	150	153	142	146	143	149	142	144	0.470 2	0.555 1		1.377

2.4 质控样的定值

质控样的定值由 10 个认可实验室协作完成, 采

用的方法为 DB 31 2010—2012, 检测数据见表 6, 对所有数据进行统计分析。

表 6 10 个实验室质控样定值结果

Tab. 6 Test results of quality control samples in 10 laboratories

实验室编号	吗啡		可待因		蒂巴因		罂粟碱		那可丁	
	平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	标准偏差/ %								
	1	309	4.497	912	4.110	920	3.682	173	2.625	141
2	310	2.160	901	5.715	911	0.816	173	4.110	137	3.857
3	320	3.742	899	5.437	924	4.110	166	4.110	139	5.354
4	306	3.559	911	5.715	916	3.559	167	5.099	142	3.266
5	321	5.907	916	4.643	922	5.437	172	6.164	145	2.625
6	315	5.657	907	2.867	917	4.899	169	6.944	135	3.859
7	321	3.266	916	2.494	921	2.625	172	4.922	142	3.300
8	317	4.784	903	2.867	916	4.643	176	5.793	135	2.160
9	311	4.082	911	2.055	913	4.497	171	6.236	137	3.300
10	323	4.082	898	4.110	922	3.300	173	4.989	136	3.300
总平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	315		907		918		171		139	
总标准偏差/%	5.675		2.160		5.499		2.891		3.270	

2.4.1 柯克伦检验

先利用柯克伦检验,对其标准差的最大值进行检验,查看是否有离群数据,要求所有标准差都是在重复条件下获得,且由相同数目计算结果得出。

柯克伦检验统计量计算式为:

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2} \quad (5)$$

将计算结果与临界值作比较, $C \leq C_{5\%}$, 表示结果为正确值; $C_{5\%} \leq C \leq C_{1\%}$, 表示结果为可疑值,需做进一步分析; $C \geq C_{1\%}$, 表示结果为离群值,需将该结果剔除,其他数据作进一步统计分析。协同定值的实验室数 $P = 10$, 每个实验室测定数 $n = 3$, 查柯克伦检验 5% 的临界值为 0.445, 1% 的临界值为 0.536。

对于可待因, 2 号实验室与 4 号实验室的标准偏差最大, 计算 $C = 0.184$, 对于蒂巴因, 5 号实验室的标准偏差最大, 计算 $C = 0.188$, 对于吗啡, 5 号实验室的标准偏差最大, 计算 $C = 0.188$, 对于罂粟碱, 6 号实验室的标准偏差最大, 计算 $C = 0.176$, 对于那可丁, 3 号实验室的标准偏差最大, 计算 $C = 0.236$ 。由以上计算结果可以看出, 5 个指标的检验统计量 $C \leq C_{5\%}$, 则 10 个实验室的检验结果全部通过柯克伦检验。

2.4.2 对 10 个实验室的检测均值进行单值格拉布斯检验

利用单格拉布斯检验分析 10 个实验室检验结果平均值之间的变异, 格拉布斯检验统计量计算公式为 $G_{1p} = (X_{1p} - \bar{X})/S$ 或 $G_{11} = (X_{11} - \bar{X})/S$, 式中 G_{1p} 、 G_{11} 为平均值的最大值、最小值统计量, X_{1p} 、 X_{11} 为平均值的最大值、最小值, \bar{X} 为总平均值, S 为平均值标准偏差。将计算结果与临界值作比较, $G_1 \leq G_{5\%}$, 表示该实验室结果为正确值; $G_{5\%} \leq G_1 \leq G_{1\%}$, 表示该实验室结果为可疑值; $G_1 \geq C_{1\%}$, 表示该结果与其他结果有较大的误差, 需将该结果剔除, 其他数据作进一步统计分析。

实验室数 $P = 10$, 查格拉布斯检验的临界值表, $G_{5\%}$ 的临界值为 2.290, $G_{1\%}$ 的临界值为 2.482, 经计算 5 个指标的 $G_1 < G_{5\%}$, 所有数据的均值可保留参加双值格拉布斯检验。

2.4.3 对 10 个实验室的检测均值进行双值格拉布斯检验

双格拉布斯检验量 G_{2p} 的计算式为:

$$G_{2p} = \frac{S_{(P-1,P)}^2}{S_0^2}, \quad (6)$$

$$G_{21} = \frac{S_{(1,2)}^2}{S_0^2} \quad (7)$$

式(6)和式(7)中 G_{2p} 是检验最大的两个值是否为离群值, G_{21} 是检验最小的两个值是否为离群值, $S_{(P-1,P)}^2$ 为 P 个数据去除最大两个值后的方差, $S_{(1,2)}^2$ 为 P 个数据去除最小两个值后的方差, S_0^2 为原数组方差。将计算结果与临界值作比较, $G_2 \leq G_{5\%}$, 表示结果为正确值; $G_{5\%} \leq G_2 \leq G_{1\%}$, 表示结果为可疑值; $G_2 \geq C_{1\%}$, 表示结果为离群值, 表明该结果与其他结果有较大的误差, 需将该结果剔除, 其他数据作进一步统计分析。

协同定值的实验室数 $P = 10$, 查格拉布斯检验的临界值表, $G_{5\%}$ 的临界值为 0.1864, $G_{1\%}$ 的临界值为 0.1150。经计算, 5 个指标的 $G_2 \geq G_{5\%}$, 所有数据均为正确值, 均可保留并参与定值。

2.5 不确定度评估

不确定度的评定参考 GB/T 15000.3—2008, 本批质控样采用的定值方式是由 10 家实验室协同定值的方案, 引入的不确定度主要包括测定值的标准不确定度 μ_{char} 、瓶间差异引入的不确定度 μ_{bb} 、长期稳定性引入的不确定度 μ_{lis} 、短期稳定性引入的不确定度 μ_{sts} , 最终的不确定度由其合成不确定度表示。

2.5.1 测定值的标准不确定度

检测数据经柯克伦检验与格拉布斯检验分析, 所有数据均可保留并参与最终定值, 参考物质的定值即为各实验室平均值的均值, 与平均值有关的合成标准不确定计算式为:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^P (Y_i - \bar{Y})^2}{P - 1}, \quad (8)$$

$$u_{\text{char}} = \frac{S}{\sqrt{P}} \quad (9)$$

式(8)和式(9)中 \bar{Y} 为实验室检测结果总平均值, Y_i 为实验室检测结果平均值, P 为实验室数, S 为平均值标准偏差。

2.5.2 瓶间差异引入的不确定度

在对质控样均匀性研究中, 瓶间均匀性已被验证, 统计方法采用单因素方差分析, 由下列公式计算瓶间差异引入的不确定度 μ_{bb} 。

瓶间方差计算式:

$$S_A^2 = \frac{MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}}{n_0}, \quad (10)$$

式(10)中 MS_{among} 为组间方差, MS_{within} 为组内方差, n_0 为每组实验个数。

瓶间标准偏差计算式:

$$S_{\text{bb}} = \sqrt{S_A^2}, \quad (11)$$

重复性标准偏差计算式:

$$S_{\text{rr}} = \sqrt{MS_{\text{within}}}, \quad (12)$$

由瓶间均匀度引入的不确定度计算式:

$$u_{\text{bb}} = \sqrt{\frac{S_{\text{bb}}^2}{p} + \frac{S_{\text{r}}^2}{n_0 p}}。 \quad (13)$$

其中 P 为实验室个数。

2.5.3 长期稳定性引入的不确定度

稳定性数据统计采用线性拟合方程模型,由稳定性研究结果表明,在14个月期间样品是稳定的,长期稳定性不确定度 μ_{lis} 的计算公式为 $\mu_{\text{lis}} = S_b \times t$,由表5计算的 S_b 带入公式计算得 μ_{lis} 。

2.5.4 合成不确定度

合成不确定度是通过对待质控样的定值、均匀性和稳定性对特性值对总不确定度的贡献来计算的,计算式为 $u_{\text{CRM}} = k \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{lis}}^2 + u_{\text{sts}}^2}$,其中置信水平为95%时, $k=2$ 。本批质控样定值方式是协同定值,短期稳定性引入的不确定度已包含在实验室的检测值中,故此处 $\mu_{\text{sts}} = 0$ 。各不确定与合成不确定度计算结果见表7。

质控样最终确定标准值由定值的总平均值与不确定度组成,结果为:可待因(907 ± 20.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$,蒂巴因(918 ± 18.4) $\mu\text{g}/\text{kg}$,吗啡(315 ± 16.5) $\mu\text{g}/\text{kg}$,罂粟碱(171 ± 12.6) $\mu\text{g}/\text{kg}$,那可丁(139 ± 15.8) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。参考物质的稳定性只研究至14个月,则暂定其保质期为14个月,如材料的稳定性得到进一步证明,则有效期还可延长。

表7 质控样不确定度评估表

Tab.7 Uncertainty of matrix reference material

名称	μ_{char}	μ_{bb}	μ_{lis}	μ_{sts}	μ_{CRM}
可待因	2.04	1.22	10.2	0	20.9
蒂巴因	1.74	1.05	8.98	0	18.4
吗啡	1.79	1.18	7.99	0	16.5
罂粟碱	0.914	1.13	6.15	0	12.6
那可丁	1.03	0.856	7.77	0	15.8

3 结论

本研究建立了一种固体复合香辛料中罂粟壳质控样的制备方法。在制备过程中采用了微波干燥技术,并控制水分含量在5%以下,该方法干燥条件短,且能很好地保持基质材料和罂粟壳的原始状态,有利于其粉碎,也能提高后期的混合效率;基体粉末与罂粟壳粉末混合采用三维混合法,该方式使混合的均匀程度达到最大化,效率高;拮抗剂的加入,可以防止质控样聚集结块,保持其松散或自由流动,且不影响对生物碱类物质的检测;采用辐照杀菌,即能杀死微生物,延长保质期,还能保证生物碱类物质不被破坏;定值由10家通过认可的实验室协作完成,结果量值可靠,均匀性与稳定性良好。利用该方法制备的质控样用于检测方法的开发、检测过程的质量控制、实验室能力验证及在快速检测领域应用等具有重要意义。

参考文献:

- [1] 贾洪锋,苏扬,周凌洁.我国复合调味料的研究进展[J].中国调味品,2014,39(5):129-133.
JIA H F, SU Y, ZHOU L J. Research progress of compound seasonings in China [J]. China Condiment, 2014, 39(5):129-133.
- [2] 杨铭铎,于洋.复合调味料的研究进展[J].黑龙江科学,2017,8(21):156-159.
YANG M D, YU Y. The research progress of compound seasoning [J]. Heilongjiang Science, 2017, 8(21):156-159.
- [3] 陈洪榕,陈巧玲.中国食品安全档案[M].北京:金盾出版社,2015:259-262.
CHEN H R, CHEN Q L. China food safety archives [M]. Beijing: Golden Shield Press, 2015:259-262.
- [4] 谢志浩.健康产品中非法添加化学成分快速筛查方法理论与实践[M].广州:华南理工大学出版社,2011:1166-1169.
XIE Z H. Theory and practice of rapid screening method for illegally added chemical constituents in health products [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2011:1166-1169.
- [5] SAMIRAN P, ANINDYA C, CHANDAN S, et al. Morphine and codeine in the water extract of poppy straw: a traditional substitution used by drug users in Calcutta, India [J]. International Journal of Drug Policy, 2003, 10(4):

- 214 - 216.
- [6] 李雕,李进瞳,曾燕,等. 不同等级罂粟壳有效成分含量的研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(17):2246 - 2249.
LI D, LI J T, ZENG Y, et al. Study on the contents of active components in different grade of poppy[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(17): 2246 - 2249.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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名单(第1—5批汇总)[EB/OL]. (2011-04-19)[2017-04-22]. <http://www.nhfp.gov.cn/zwgkzt/wsbysj/201104/51441.shtml>.
- [8] 皮立,胡凤祖,师治贤. 高效液相色谱-荧光检测法测定罂粟籽和火锅汤料中的罂粟碱[J]. 色谱,2005,23(6):639.
PI L, HU F Z, SHI Z X. Determination of papaverine in seeds of *Papaver Somniferum* L. and soup of chafing dish by high performance liquid chromatography-fluorescence detection[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2005, 23(6):639.
- [9] 林黛琴,王婷婷,万承波,等. 高效液相色谱-串联质谱法快速测定食品中5种罂粟壳生物碱[J]. 质谱学报,2017,2(38):239-247.
LIN D Q, WANG T T, WAN C B, et al. Rapid determination of five opium poppy husk alkaloids in foods by HPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 2(38):239-247.
- [10] 乔庆东. 火锅底料中5种生物碱含量的高效液相色谱-三重四级杆串联质谱测定法[J]. 职业与健康,2017,9(33):2483-2493.
QIAO Q D. Determination of 5 alkaloids in hot pot condiment by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Occupation and Health, 2017, 9(33):2483-2493.
- [11] 张百乐,高黎红,解迎双,等. 实时直接分析-串联质谱法快速筛查火锅底料、牛肉面汤及调味料中罂粟壳生物碱[J]. 职业与健康,2017,7(35):724-729.
ZHANG B L, GAO L H, XIE Y S, et al. Rapid screening the alkaloids of poppy shell in hot pot condiment, beef noodle soup and seasoning by direct analysis in real time - tandem mass spectrometry[J]. Occupation and Health, 2017, 7(35):724-729.
- [12] REDDY M M, SUMSH V, JAYASHANKER G, et al. Application of capillary zone electrophoresis in the separation and determination of the principal gum opiumalkaloids[J]. Electrophoresis, 2003, 24(9):1437-1441.
- [13] 沈平,谢朝梅,谢燕湘,等. GC-MS法直接测定食品中罂粟壳提取物的残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(20):3466-3468.
SHEN P, XIE C M, XIE Y X, et al. Direct determination of residues of poppy shell extracts in food by GC-MS[J]. China Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(20):3466-3468.
- [14] 刘洋,张辉,陆志芸,等. 复合调味粉中罂粟成分的实时荧光PCR检测方法[J]. 中国调味品,2011,7(36):93-96.
LIU Y, ZHANG H, LU Z Y, et al. A method of real-time PCR for detection of *Papaver somniferum* in mixed seasoning powder[J]. China Condiment, 2011, 7(36):93-96.
- [15] 朱振华,朱士新,陈璐,等. 罂粟壳成分快速检测方法在食品监督中的应用[J]. 中国食物与营养,2015,21(3):8-10.
ZHU Z H, ZHU S X, CHEN L, et al. Application of rapid detection method of poppy shell components in food supervision[J]. Food and Nutrition in China, 2015, 21(3):8-10.
- [16] 刘亚雄,刘丛丛,庄玥,等. 基于电子鼻技术对调味品中非法添加罂粟壳的检测[J]. 中国食物与营养,2017,7(3):81-85.
LIU Y C, LIU C C, ZHUANG Y, et al. Detection of condiments illegally added by pericarpium papaveris using electronic nose[J]. Food and Nutrition in China, 2017, 7(3):81-85.
- [17] 朱德泉,王继先,朱德文,等. 小麦微波干燥特性及其对品质的影响[J]. 农业工程学报,2006,22(4):182-185.
ZHU D Q, WANG J X, ZHU D W, et al. Experimental study on wheat grain microwave drying characteristics and its effect on the quality of wheat grain[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(4):182-185.
- [18] 赵超,陈建,邱兵,等. 花椒微波干燥特性试验[J]. 农业机械学报,2007,38(3):98-101.
ZHAO C, CHEN J, QIU B, et al. Experimental study on microwave drying characteristics of Chinese prickly ash[J]. Transactions of the CSAM, 2007, 38(3):98-101.