

## GBW(E)100674 乙腈中展青霉素溶液标准物质的研制



李先江, 国振, 赵光亮, 李秀琴, 张庆合, 李红梅

中国计量科学研究院, 北京 100029

**【摘要】** 本课题研制了乙腈中展青霉素的溶液标准物质 1 种, 并已成功申报为国家二级标准物质 (GBW(E)100674)。该溶液标准物质以展青霉素纯度国家二级标准物质 (GBW(E)100673) 为原料, 采用重量容量法配制。依据 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》的要求, 本研究采用液相色谱法对乙腈中展青霉素溶液标准物质进行均匀性、短期稳定性和长期稳定性的评价。定值不确定度包含原料纯度、溶液配制、均匀性、短期稳定性和长期稳定性五个方面引入的不确定度。最终, 该溶液标准物质 GBW(E)100674 的定值结果为 100  $\mu\text{g/mL}$ , 不确定度为 2%。本研究研制展青霉素溶液标准物质的量值具有溯源性和准确性, 可以支持国家食品安全检测的需要。

**【关键词】** 展青霉素; 标准物质; 均匀性; 稳定性; 不确定度; 乙腈

**DOI:** 10.12338/j.issn.2096-9015.2020.9047

**【引用本文】** 李先江, 国振, 赵光亮, 等. GBW(E)100674 乙腈中展青霉素溶液标准物质的研制 [J]. 计量科学与技术, 2021, 65(6): 34-38, 24.

## Development of Certified Reference Materials of Patulin in Acetonitrile GBW(E)100674

LI Xianjiang, GUO Zhen, ZHAO Guangliang, LI Xiuqin, ZHANG Qinghe, LI Hongmei

National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

**【Abstract】** A solution Certified Reference Material (CRM) of patulin was developed and has been officially approved with the code of GBW(E)100674. This CRM was prepared by using the gravimetric-volumetric method with solid materials of the patulin purity CRM GBW(E)100673. According to the general and statistical principles for characterization of reference materials in JJF 1343-2012, homogeneity and stability tests were carried out with liquid chromatography. Uncertainty was evaluated in consideration of solid purity, solution preparation, homogeneity, short-term stability, and long-term stability. The certified value of the patulin solution is 100  $\mu\text{g/mL}$  with an expanded uncertainty of 2% ( $k=2$ ). The atulin solution CRM with a traceable and accurate value can support food safety tests in China.

**【Key words】** patulin, CRMs, homogeneity, stability, uncertainty, acetonitrile

### 0 引言

展青霉素(Puautulin)又称棒曲毒素、珊瑚青霉毒素,是一种具有致畸性和致癌性的有毒真菌代谢产物,很多青霉都能产生展青霉素。据报道,60多种霉菌可以产生展青霉素,包括扩张青霉、展青霉、棒状曲霉、石状青霉、产黄青霉、新西兰青霉、粒状青霉、圆弧青霉、巨大曲霉、萎地青霉、土曲霉等<sup>[1]</sup>,其中棒曲霉和展青霉的产毒能力最强<sup>[2]</sup>。许多食品

如腐烂变质的苹果、山楂、桑葚、香蕉、樱桃、柿子、葡萄、梨、李子、桃、覆盆子、黑加仑、草莓、油桃、西红柿、蓝莓、核桃、杏仁、花生、奶酪、榛子、麦芽、饲料和谷物等及其制品中均有发现展青霉素的存在<sup>[3]</sup>。展青霉素在霉变的水果中普遍存在已是不争的事实,但从其外观看起来在新鲜的水果中也有可能存在。由于展青霉素具有较强的亲电性质,它可以与色氨酸、谷胱甘肽、蛋白质等亲核的含氨基或巯基类化合物发生作用<sup>[4]</sup>。此外,展青霉素的

基金项目:国家重点研发计划(2016YFF0201106)。

作者简介:李先江(1988-),中国计量科学研究院副研究员,研究方向:食品安全,邮箱:lixianjiang@nim.ac.cn。

毒性也源于它能够与很多巯基生物大分子形成复合物,进而影响生物体的正常机能<sup>[5]</sup>。

考虑到它的污染普遍性和危害严重性,诸多国家对各种食品中展青霉素污染问题高度重视,同时食品相关管理机构对其中展青霉素的含量制定了严格的限量标准<sup>[6]</sup>。中国是世界上最大的浓缩苹果汁生产商和出口商,而当前的果汁加工部分的是鲜食品种中的残次果,而残次果比例过高易导致果汁成品中展青霉素含量超标,严重影响了我国外贸出口。因此,GB 2761-2017《食品中真菌毒素限量》国家食品安全标准中规定含有山楂或者苹果成分的果汁或者酒水中展青霉素的最大限量为 50  $\mu\text{g/L}$ 。欧盟 EC 1881/2006 文件中限量标准为:婴儿食品中为 10  $\mu\text{g/L}$ , 固态苹果产品中为 25  $\mu\text{g/L}$ , 果汁和酒精饮料中为 50  $\mu\text{g/L}$ 。美国食品药品监督管理局 (FDA) 在 CPG Sec.510.150 文件中规定苹果汁或者含有苹果汁成分的食品中展青霉素含量上限为 50  $\mu\text{g/L}$ 。

目前,展青霉素的检测领域广泛采用的方法为液相色谱质谱联用法<sup>[7-11]</sup>和液相色谱法<sup>[12-14]</sup>,但是缺乏相应的国家有证标准物质,难以保障食品中展青霉素的检测结果的可靠性和一致性。因此,本课题研制了乙腈中展青霉素溶液标准物质 (GBW(E) 100674),有助于确保食品中展青霉素检测结果的溯源性、准确性和可比性,对于保障食品安全具有重要的意义。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司),接 HSS T<sub>3</sub> (2.1 x 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; XP205 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 高纯水发生器 (美国密理博公司)。

乙腈 (德国默克公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水; 展青霉素有证标准物质 GBW(E)100673(99.7%,  $U=0.3\%$ ,  $k=2$ , 中国计量科学研究院)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 展青霉素溶液标准物质制备与初测

研制的溶液标准物质以展青霉素纯度标准物质为原料,纯度和不确定度为 (99.7 $\pm$ 0.3)%,以乙腈溶液为溶剂,采用重量-容量法配制,浓度 100  $\mu\text{g/mL}$  的展青霉素乙腈溶液候选样品。配制过程中,操作者佩戴防毒面具,身穿防护服,佩戴手套,在通风橱

中开启纯度标准物质。配制温度 (20 $\pm$ 4)  $^{\circ}\text{C}$ ,天平感量 0.01 mg,具体配置步骤如下:使用经计量检定合格的微量天平,准确称量展青霉素固体 50.15 mg,并用乙腈溶解于 500 mL 棕色容量瓶中。溶液经过定容、超声、多次混匀,过夜静置,低温冷却后用棕色安培瓶分装 200 瓶。每瓶 2 mL,编号后,密封储存在干燥、低温 (-20  $^{\circ}\text{C}$ )、避光处作为溶液标准物质候选样品。折算原料纯度后,最终配制浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。

测试方法:进样体积为 3  $\mu\text{L}$ ; 色谱柱温度 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 样品室温度 15  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 0.3 mL/min; 流动相 A 相为水, B 相为乙腈,采用梯度洗脱方法,0~1 min 内 H<sub>2</sub>O:ACN=99:1; 1~3 min 内 H<sub>2</sub>O:ACN=80:20; 3~4 min 恢复初始流动相; 检测波长 275 nm。

#### 1.2.2 标准物质的均匀性检验

均匀性是国家有证标准物质的基本属性,用于描述其特性量值的空间分布特征。因此,在展青霉素溶液标准物质的研制过程中必须进行均匀性检验,以验证其是否具有良好的均匀性<sup>[15]</sup>。

根据 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理的要求》,本课题对展青霉素溶液标准物质进行均匀性检验。因此,本研究按照整个分装过程的前、中、后时间阶段,从已分装的展青霉素溶液标准物质的 200 个包装中随机抽取 12 个包装单元,对随机抽取的样品从 1 到 12 编号。每个包装单元取 3 个子样,同时进行瓶内和瓶间均匀性检验。每个子样的取样量为 0.6 mL,按照上述的超高效液相色谱法对其均匀性进行测试,对测定的结果采用单因素方差分析法评估样品的均匀性。将均匀性方差分析结果  $s_{bb}$  与所采用方法的重复性  $s_r$  或不确定度的预期数值进行比较,若  $s_{bb}$  不显著,则判定该展青霉素溶液标准物质为均匀。则计算待测浓度量值的不均匀性引入的不确定度分量  $u_{bb}$ ,并最终将该分量  $u_{bb}$  计入标准物质总的合成不确定度中。

#### 1.2.3 标准物质的短期稳定性检验

稳定性也是国家有证标准物质的基本属性,用于描述其特性量值的时间分布特征。根据 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理的要求》,在乙腈中展青霉素溶液标准物质的研制过程中必须进行稳定性评估,包括短期稳定性和长期稳定性两个方面,以验证其是否具有良好的稳定性。稳定性评估不但要计算与标准物质稳定性相关

的测量不确定度分量,而且能明确标准物质合适的保存和运输条件。

稳定性评估数据判断的第一步是检查所观测数据是否有趋势性变化,应基于这个时间段内特性量值的变化趋势与标准物质特性量相关的不确定度和期望的保存期来进行判断。可采用展青霉素溶液标准物质浓度值随时间变化曲线来判断是否具有单方向变化趋势。若所有的测量结果在测量方法的精密度范围内随机变化,则认为其特性量值在此考察的时间间隔内稳定。该时间间隔可作为展青霉素溶液标准物质的有效期,并可根据后续的稳定性的监测的进行随时延长其有效期。在此过程中,应将特征值变动带来的不确定度统计到标准物质总的合成不确定度内。

若展青霉素溶液标准物质的测量结果在监测时间内有单方向变化趋势,则通过线性回归曲线方法来进行稳定性检验结果的判断。稳定性检验基本模型可表示为公式:

$$Y = \beta_0 - \beta_1 X$$

式中: $\beta_1$ 、 $\beta_0$ 为回归系数; $X$ 为时间; $Y$ 为展青霉素溶液标准物质的浓度值。对于足够稳定的标准物质, $\beta_1$ 的数学期望值应为零。

考虑到该类标准物质在运输过程中可能会出现异常温度值的情况,因此采取同步稳定性评估的方法进行短期稳定性考察。在两个不同的考察温度(40℃±2℃、4℃±2℃)下,保存0、1、3、7天后测定样品的短期稳定性。每次取3个标准物质样品,每个样品取3个子样,按照前述的高效液相色谱法测3次并计算平均值,把9个子样的测量结果平均值作为短期稳定性检测结果。

### 1.2.4 标准物质的长期稳定性检验

对于研制的展青霉素溶液标准物质,按先密后疏的原则,采取同步稳定性评估的方法进行长期稳定性检验。考察在-20℃避光保存条件下,保存0、1、3、6、9个月后测定展青霉素溶液标准物质的长期稳定性。每次取3个样品,每个样品取3个子样,按照前述的超高效液相色谱法平行测3次并计算平均值,把9个子样的测量结果平均值作为检验结果。根据JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理的要求》采用趋势分析法对标准物质的稳定性监测数据进行计算,以检测时间和结果拟合直线,对结果进行统计分析,并评价由稳定性引入

的不确定度,以测定结果的变动在定值结果不确定度范围内作为判定展青霉素溶液标准物质稳定的原则。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶液标准物质初测

取一支展青霉素溶液标准物质,用等体积去离子水稀释后,按照前述方法进行测定,展青霉素保留时间为2.9 min,得到的色谱图如下图1所示。

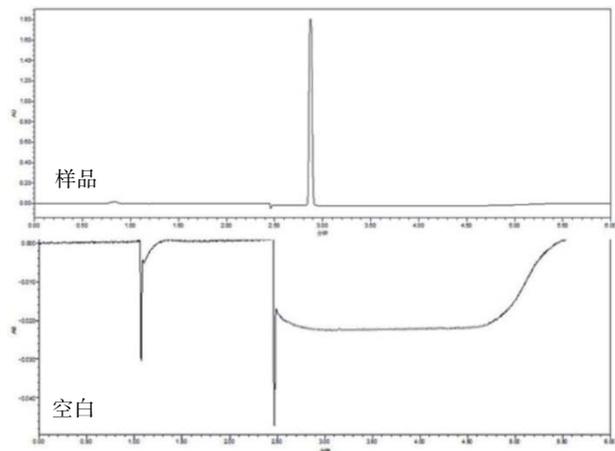


图1 展青霉素溶液标准物质和溶剂空白的色谱图  
Fig.1 Chromatogram of the patulin CRM and blank

### 2.2 均匀性检验

采用单因素方差分析法评估样品的均匀性,对于展青霉素溶液标准物质:

$$\text{组间差方和: } Q_1 = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2 = 8.91; \text{组内差}$$

$$\text{方和: } Q_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} - \bar{x}_i^2 = 12.59;$$

$$\text{自由度: } v_1 = m - 1 = 11, \quad v_2 = N - m = 24;$$

$$\text{组间方差: } s_1^2 = \frac{Q_1}{v_1} = 0.81; \text{组内方差: } s_2^2 = \frac{Q_2}{v_2} = 0.52。$$

展青霉素标准物质均匀性结果如图2所示,由于组间方差大于组内方差 $s_1^2 > s_2^2$ ,均匀性研究的测量方法重复性较好, $s_{bb} = \sqrt{\frac{s_1^2 - s_2^2}{n}} = 0.31 \mu\text{g/mL}$ ;然而,组间标准偏差 $s_{bb}$ 小于重复性标准偏差 $s_r$ ,则需要进一步考察重复性标准偏差 $s_r$ 对 $s_{bb}$ 的影响,以反映 $s_r$ 相对较大的情况对不确定度影响,故估计得到的瓶间标准偏差 $s'_{bb}$ 计算为: $s'_{bb} = \sqrt{\frac{s_2^2}{n}} \cdot \sqrt{\frac{2}{v_{s_2}}} = 0.22 \mu\text{g/mL}$ 。因为 $s'_{bb}$ 小于 $s_r$ 对 $s_{bb}$ 的影响,所以最

终瓶间均匀性标准偏差影响的不确定度  $u_{bb} = s_{bb} = 0.31 \mu\text{g/mL}$ 。

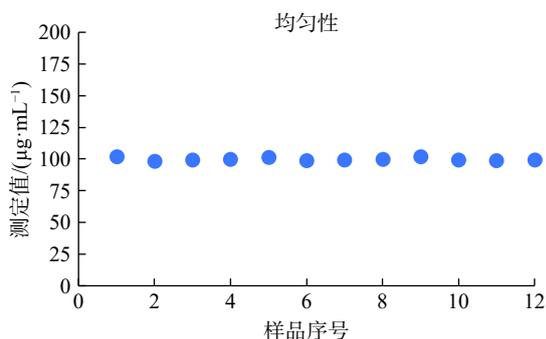


图 2 展青霉素溶液标准物质均匀性检验结果 (100 μg/mL)  
Fig.2 Homogeneity test result of the patulin CRM (100 μg/mL)

### 2.3 短期稳定性检验

因为目前没有合适的化学模型能够真实地描述展青霉素的短期降解机理,因此本课题选用线性模型作为展青霉素溶液标准物质降解的经验模型。对于展青霉素溶液标准物质,40 °C 和 4 °C 下短期稳定性检测结果见图 3 和图 4。

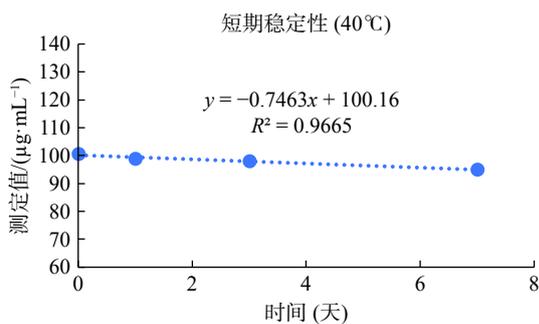


图 3 展青霉素标准物质的稳定性变化趋势  
Fig.3 Short-term stability of the patulin CRM at 40 °C

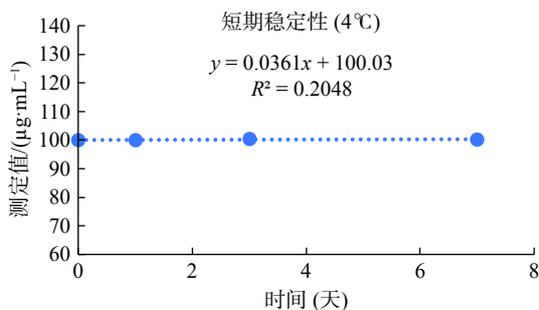


图 4 展青霉素标准物质的稳定性变化趋势  
Fig.4 Short-term stability of the patulin CRM at 4 °C

在 40 °C 条件下,斜率回归系数  $\beta_1 = -0.7463$ , 截距  $\beta_0 = 100.16$ , 斜率的标准偏差  $s(\beta_1) = 0.00$ 。在置信

水平  $p=0.95$ , 自由度为  $n-2=2$  条件下,  $t$ -检验的临界值为 4.30。由于  $|\beta_1| > t_{0.95, n-2} \cdot s(\beta_1)$ , 故斜率显著。在监测时间范围内,标准物质特性量值有趋势性降低,认为标准物质在 7 天 ( $40 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ ) 内不稳定,不能保证运输过程中标准物质的稳定性。

在 4 °C 条件下,斜率回归系数  $\beta_1 = 0.0361$ , 截距  $\beta_0 = 100.033$ , 斜率的标准偏差  $s(\beta_1) = 0.050$ 。在置信水平  $p=0.95$ , 自由度为  $n-2=2$  条件下,  $t$ -检验的临界值为 4.30。由于  $|\beta_1| < t \cdot s(\beta_1)$ , 故斜率并不显著。在监测时间范围内,标准物质特性量值不存在趋势性变化。综上,展青霉素标准物质在 4 °C 的模拟运输温度,7 天的运输时间条件下特征量值稳定,不确定度  $u_{ss} = t \cdot s(\beta_1) = 0.3519 \mu\text{g/mL}$ 。

### 2.4 长期稳定性检验

同理,因为目前没有化学模型能够真实地描述展青霉素的长期降解机理,因此本课题选用线性模型作为展青霉素溶液标准物质长期降解的经验模型。结果如图 5 所示。斜率回归系数  $\beta_1 = -0.0008$ , 截距  $\beta_0 = 99.958$ , 斜率的标准偏差  $s(\beta_1) = 0.06$ 。在自由度为  $n-2=3$ , 置信水平  $p=0.95$  (95% 的显著水平) 条件下,  $t$ -检验的临界值为 3.18。由于  $|\beta_1| < t \cdot s(\beta_1)$ , 表明斜率不显著,因此没有观察到不稳定性。不确定度  $u_{ls} = t \cdot s(\beta_1) = 0.56 \mu\text{g/mL}$ 。综上所述,展青霉素标准物质 9 个月长期稳定性良好。

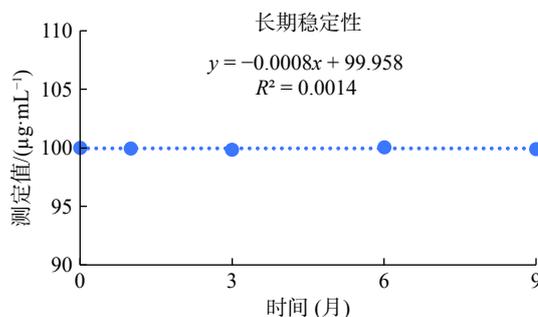


图 5 长期稳定性监测结果  
Fig.5 Long-term stability of the patulin CRM

### 2.5 不确定度评定

展青霉素溶液标准物质定值结果的不确定度来自 4 个分量:展青霉素原料纯度的不确定度、展青霉素溶液配制过程中引入的不确定度、溶液不均匀性引入的不确定度和溶液不稳定性引入的不确定度。

#### 2.5.1 展青霉素原料纯度的不确定度

原料纯度不确定度直接由原料证书获得,其相对标准不确定度为:  $u_p = 0.15\%$ 。

### 2.5.2 展青霉素溶液配制过程中引入的不确定度

#### a. 用天平称量展青霉素纯品时引入的不确定度

##### ①天平的变动性引入的不确定度

查阅天平的检定证书, 可知其变动性为 0.01 mg, 按照矩形分布计算, 则:  $u_{v1}=0.01/\sqrt{3}=0.00577$  mg。

展青霉素净重为两次称量差减所得, 同时每次称重均为独立结果, 故计算两次合并值为:

$$u_{v2} = \sqrt{2 \times u_{v1}^2} = \sqrt{2 \times 0.00577^2} = 0.0082 \text{ mg}$$

##### ②天平的最大允差引入的不确定度

查阅天平检定证书, 可知其最大允差为 0.005 mg, 按照矩形分布计算, 则:  $u_{m1}=0.005/\sqrt{3}=0.00289$  mg。

同样, 展青霉素净重为两次独立称量所得。每一次称量均为独立结果, 故计算两次合并值为:

$$u_{m2} = \sqrt{2 \times u_{m1}^2} = \sqrt{2 \times 0.00289^2} = 0.0041 \text{ mg}$$

##### ③浮力的影响

由于展青霉素溶液标准物质预期不确定度较大, 因此浮力的影响在此可忽略不计。

综上, 天平称量展青霉素纯品时引入的合成标准不确定度为:  $u_w = \sqrt{u_{v2}^2 + u_{m2}^2} = \sqrt{0.0082^2 + 0.0041^2} = 0.0091$  mg

相对不确定度:  $u_{rel-w} = 0.0091 \text{ mg}/50.15 \text{ mg} = 0.0183\%$ 。

#### b. 体积引入的不确定度

##### ①容量瓶校准引入的不确定度:

根据国家计量检定规程 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》的要求, 课题使用的 500 mL 容量瓶的最大允许误差为 0.25 mL, 按照三角形分布计算, 500 mL 容量瓶校准引入的标准不确定度为:  $u_{cal}=0.25/\sqrt{6}=0.102$  mL

②肉眼观测容量瓶刻度线引入的不确定度: 该项不确定度可由观测容量瓶重复性来评估, 10 次观测的标准偏差为 0.05 mL, 即为  $u_r=0.05$  mL

③温度对体积的影响: 温度引入的不确定度可通过容量瓶校准温度 (20°C) 和实验室温度 (20±5)°C 范围内容器和溶剂体积膨胀来估算。因为溶剂的体积膨胀系数要明显大于容量瓶的体积膨胀系数, 因此主要考虑乙腈溶剂的膨胀, 其体积膨胀系数为  $1.36 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$ 。按照矩形分布计算, 则温度对体积影响的标准不确定度为:  $u_T=500 \times 5 \times 1.36 \times 10^{-3}/\sqrt{3}=1.96$  mL。

综上, 体积引入的合成标准不确定度为:  $u_{vol} =$

$$\sqrt{u_{cal}^2 + u_r^2 + u_T^2} = \sqrt{0.102^2 + 0.05^2 + 1.96^2} = 1.96 \text{ mL}, \text{ 相}$$

对不确定度为:  $u_{rel-vol}=1.96/500=0.393\%$

展青霉素溶液的配制过程中称量和体积引入的合成相对不确定度为:

$$u_{sol} = \sqrt{u_{rel-w}^2 + u_{rel-vol}^2} = \sqrt{0.0183\%^2 + 0.393\%^2} = 0.39\%$$

### 2.5.3 溶液不均匀性引入的不确定度

展青霉素溶液标准物质不均匀性引入的不确定度  $u_{bb}$  以独立测量的平行实验结果来表示。由 2.2 节可知, 相对不确定度为  $u_{bb}=0.31\%$ 。

### 2.5.4 不稳定性引入的不确定度

由 2.3 节可知, 展青霉素溶液标准物质短期稳定性引起的相对不确定度贡献为  $u_{ls}=0.56\%$ ; 由 2.4 节可知, 展青霉素溶液标准物质长期稳定性引起的相对不确定度贡献为  $u_{ss}=0.35\%$ 。

### 2.5.5 展青霉素溶液标准物质的合成不确定度

综合考虑以上五部分不确定度分量, 最终乙腈中展青霉素溶液标准物质定值结果的合成相对不确定度为:

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{sol}^2 + u_p^2 + u_{bb}^2 + u_{ls}^2 + u_{ss}^2} = 0.84\%$$

取包含因子为  $k=2$ , 则其扩展不确定度为:  $U=k \times u_{CRM}=2 \times 0.84\%=2\%$ 。

## 3 结论

本课题研制的乙腈中展青霉素溶液标准物质均匀性良好, 在避光-20°C 条件下可以稳定保存 9 个月以上。另外, 该标准物质已成功申报为国家二级标准物质 (GBW(E)100674), 定值结果为 100 μg/mL, 不确定度为 2%。该标准物质对于食品安全检测溯源体系的建立提供技术支撑和物质保证。

### 参考文献

- [1] Wright S A I. Patulin in food[J]. *Curr. Opin. Food Sci*, 2015, 5: 105-109.
- [2] Moake M M, Padilla-Zakour O I, Worobo R W. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods[J]. *Compr. Rev. Food Sci. F*, 2005, 4(1): 8-21.
- [3] Li X, Li H, Li X, et al. Determination of trace patulin in apple-based food matrices[J]. *Food Chem*, 2017, 233: 290-301.
- [4] Rychlik M, Kircher F, Schusdziarra V, et al. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach[J]. *Food Chem. Toxicol*, 2004, 42(5): 729-735.