

## 碱性橙 II 纯度标准物质的研制

黄彦捷<sup>1,2</sup>, 周瑾艳<sup>2†</sup>, 陈玲<sup>1,2</sup>, 许俊斌<sup>1,2</sup>, 尹强<sup>1,2</sup>,  
花秀兵<sup>2</sup>, 王世超<sup>2</sup>, 林铿<sup>2</sup>, 黄振宇<sup>1,2</sup>, 吴朝阳<sup>3‡</sup>

(1. 华南国家计量测试中心, 广东广州 510405;

2. 广东省计量科学研究院 广东省现代几何与力学计量技术重点实验室, 广东广州 510405;

3. 湖南大学 化学化工学院, 湖南长沙 410082)

**摘要:**通过原料提纯、定性分析、定量分析、均匀性试验、稳定性试验、联合定值和不確定度评定等方法对碱性橙 II 的纯度标准物质进行了研究. 对市售的碱性橙 II 原料进行重结晶, 制备了候选标准物质. 候选物经提纯、干燥后, 封装在棕色玻璃瓶中. 采用分层随机抽样的方法, 选取数个样品瓶进行均匀性和稳定性的研究, 结果表明所制备的碱性橙 II 标准物质具有良好的均匀性和足够的稳定性. 利用红外光谱、高分辨质谱和核磁共振 H 谱确证了碱性橙候选标准物的化学成分. 联合了 8 个资质实验室进行了合作认证. 采用质量平衡法(含液相色谱法面积归一化分析、含水率、灰分含量及残留溶剂分析)对其进行了纯度分析. 结果表明, 该标准物质的纯度认证值为 99.2%, 相对扩展不确定度为 1.0% ( $k=2$ ). 该纯度标准物质已被鉴定为国家二级标准物质, 编号为 GBW(E)100372, 可望用于食品和化妆品分析中的仪器校准和方法评定.

**关键词:**计量学; 碱性橙 II; 标准物质; 液相色谱; 质量平衡法

**中图分类号:** O657.7

**文献标志码:** A

## Research on a Purity Certified Reference Material of Basic Orange II

HUANG Yanjie<sup>1,2</sup>, ZHOU Jinyan<sup>1†</sup>, CHEN Ling<sup>1,2</sup>, XU Junbin<sup>1,2</sup>, YIN Qiang<sup>1,2</sup>,  
HUA Xiubin<sup>2</sup>, WANG Shichao<sup>2</sup>, LIN Keng<sup>2</sup>, HUANG Zhenyu<sup>1,2</sup>, WU Zhaoyang<sup>3‡</sup>

(1. South China National Center of Metrology, Guangzhou 510405, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Modern Geometric and Mechanical Metrology Technology, Guangdong Provincial Institute of Metrology, Guangzhou 510405, China;

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** A purity certified reference material for Basic Orange II was studied by means of raw material purification, qualitative analysis, quantitative analysis, homogeneity test, stability test, as well as characterization and uncertainty evaluation. The candidate standard substance was prepared by recrystallization of purchased Basic Orange II. The candidates were purified, dried, and then encapsulated in brown glass bottles. The homogeneity and stability of several sample bottles were studied by stratified random sampling. The chemical composition of the candidate

\* 收稿日期: 2018-08-18

基金项目: 广东省质量技术监督局科技项目(2018ZJ02, 2016CJ03), Technical Project of Guangdong Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision(2018ZJ02, 2016CJ03); 国家自然科学基金资助项目(21675045), National Natural Science Foundation of China(21675045)

作者简介: 黄彦捷(1990—), 男, 福建厦门人, 广东省计量科学研究院工程师, 博士

† 通讯联系人, E-mail: zhoujy@scm.com.cn; zyw@hnu.edu.cn

reference material of Basic Orange II was confirmed by infrared (IR) spectrum, high resolution mass spectrometry (MS) and proton nuclear magnetic resonance (NMR). 8 qualified laboratories were cooperated for certification of Basic Orange II. The purity of the product was analyzed by mass balance method (concluding area normalization, water content, ash content and residual solvent analysis by liquid chromatography). The results showed that the certified value of the purity reference material was 99.2% and the relative expansion uncertainty was 1.0% ( $k = 2$ ). The purity reference material was identified as the national grade II certified reference materials, which was numbered GBW (E)100372, and was expected to be used in the calibration of instruments and method evaluation in food and cosmetic analysis.

**Key words:** metrology; basic orange II; reference material; liquid chromatography; mass balance

食用色素是一种能在一定程度上改变食物原有颜色的食品添加剂. 合理利用食用色素, 可以使食物颜色更加丰富多彩, 对人们的食欲也有促进作用. 但随着食用色素安全性实验技术的发展, 发现有的合成色素有致癌作用, 能诱发染色体变异. 然而某些非食用色素却因其价格低廉、着色力强、稳定性好等优点一次又一次流入食品生产线. 针对一系列合成食用色素的检测方法也不断被开发出来<sup>[1-4]</sup>.

自 2008 年至今, 我国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治领导小组已陆续发布了 6 批《食品中可能违法添加的非食用物质和滥用的食品添加剂名单》, 其中可能违法添加的非食用物质名单中有 7 种为常见工业染料, 常被用作着色剂非法添加到食品中, 分别是苏丹红、玫瑰红 B (罗丹明 B)、王金黄 (碱性橙 II)、酸性橙 II、碱性嫩黄 O、美术绿、孔雀石绿、碱性黄等. 因此, 研制这些非法色素的有证标准物质, 为食品安全检测和监督管理提供重要的技术支撑, 具有非常重大的意义. 近年来, 多种色素类有证标准物质已经被开发出来<sup>[5-7]</sup>.

碱性橙 II (Basic Orange II, Chrysoidine G) 是一种偶氮类碱性工业染料, 属于碱性橙类染料的一种. 在实际生活中碱性橙 II 可用于豆制品染色, 一些不法商贩常用碱性橙 II 对豆腐皮和黄鱼进行染色<sup>[8-10]</sup>, 严重危害消费者的身体健康. 《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》及《中华人民共和国食品卫生法》规定, 碱性橙 II 为禁止用作食品添加剂的化学制剂.

本研究依据一级标准物质研制技术规范 (JJF 1006-1994)<sup>[11]</sup> 以及 ISO 17034, Guide 35 的技术要求<sup>[12-13]</sup>, 采用质量平衡法, 利用高效液相色谱<sup>[14-16]</sup>对碱性橙 II 纯度物质进行准确定值, 并全面考察碱性

橙 II 纯度测量过程中的各种影响因素 (溶剂残留、水分、灰分等). 对样品的均匀性、测量的分散性及其他因素引入的不确定度分量分析和确定后, 给出了整个测量过程不确定度的合成结果, 并对碱性橙 II 纯度标准物质的稳定性均进行了 30 个月的考察. 结果表明, 碱性橙 II 纯度标准物质性能良好, 可满足食品、药品、日化、环境保护及化工产品研究和检测的需要, 可望用于相关仪器 (色谱仪) 的校准、分析方法评价, 为统一相关量值发挥应有的作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

碱性橙 II 纯品原料 (纯度 > 95%, ACROS 公司); 甲醇、乙醇 (HPLC 试剂, 德国 Merck & Co Inc 公司); 实验用水均为实验室制备的超纯水. N, N-二甲基酰胺 (HPLC 试剂, 百灵威).

### 1.2 仪器设备

标准物质制备用器皿: 500 mL 的 A 级容量瓶 (天津玻璃仪器厂); 准确度为十万分之一天平 (CPA225D 赛多利斯, 德国); 电动移液器 (Brand, 法国); 百级洁净台等, 皆经检定合格.

Tensor-37 傅里叶红外光谱仪 (美国 Bruker); 高分辨质谱仪 (美国 Agilent 6540 Q-TOF); 核磁共振氢谱 (DPX-300 型, 美国 Bruker); Milli-Q Advantage A10 纯水系统 (美国 Millipore 公司).

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品处理及定性分析

采用市售高纯碱性橙 II 为原料, 以体积比为 3:1 的乙醇-水溶液作为溶剂在 80~100 °C 溶解原料碱性橙 II, 依次加入体积比为 1:1 的乙醇-水溶液, 同时

不断搅拌,保持温度在 $(100\pm 5)$  °C范围内,热过滤后,将滤液冷却室温,随后放置在温度为4 °C的条件下进行重结晶,结晶体过滤后,置于温度为105 °C条件下干燥,经研磨过筛,混匀、干燥后即得碱性橙 II 标准物质,并将其置于填充有五氧化二磷的干燥器中干燥 24 h,为后续实验备用。

将纯化后的碱性橙 II 纯度样品分装于棕色玻璃样品瓶中,每瓶 200 mg,共分装约 400 瓶。将封装好的样品放置于 4 °C 冰箱中保存。

进行纯度测试之前,分别采用红外光谱法、高分辨质谱法和核磁共振 H 谱对候选碱性橙 II 纯度标注物质进行定性分析,将实验所得谱图及与标准谱图 (Spectral Database for Organic Compounds, SDBS) 进行对照。

### 1.3.2 质量平衡法

1) 联合定值. 碱性橙 II 候选物的纯度采用多家实验室合作定值,定值方法为液相色谱面积归一化法。每家实验室仪器使用前均经法定计量机构检定合格,各实验室从全部样品中随机抽取 3 个包装,从每瓶中任意取出 1~3 个子样,用色谱级甲醇当溶剂配制测试液,使用液相色谱法测量碱性橙 II 纯度标准物质。

液相色谱方法:选取二极管阵列检测器,C18 色谱柱,以甲醇和 0.2 mol/mL 的乙酸铵为流动相,配比为 65:35,流速为 1.0 mL/min,设定检测波长为 407 nm。

2) 测定溶剂残留. 采用顶空进样-气相色谱法分析碱性橙 II 中可能的溶剂残留为乙醇<sup>[17]</sup>,称取适量样品溶解在 N,N-二甲基酰胺中,在 105 °C 温度下平衡 60 min,采用静态顶空-GC-FID 检测器测定残留溶剂,采用标准加入法定量分析残留溶剂。

3) 测定水分. 碱性橙 II 候选物纯品的水分采用卡尔费休水分测定仪测试,准确称取适量样品,约 1 g 左右,精确到 0.01 mg,重复测量 6 次,取平均值作为水分测试结果。

4) 测定灼烧灰分. 碱性橙 II 候选物纯品的灰分通过高温灼烧测得,准确称取适量样品,约 1 g 左右,精确到 0.01 mg,在 $(650\pm 50)$  °C 的马弗炉中灼烧至恒重,称重测得结果,重复 6 次测量,取平均值作为实验结果。

### 1.3.3 均匀性分析

标准物质均匀性试验通常是随机选择一定数量的样品,采用高精度试验方法进行试验。参照标准物质技术规范,分别从 400 瓶已经分装好并编上号码的碱性橙 II 纯度样品中按照头尾、中间编号各随机抽取 15 瓶样品。准确称量抽取的样品约 10

mg,配制成溶液,采用液相色谱-面积归一化法测定纯度,每瓶样品平行进样 3 次,每次测量的平均值作为均匀性评价的结果,然后对其进行方差分析。

### 1.3.4 稳定性检验

1) 长期稳定性. 长期跟踪标准物质的稳定性,按照前紧后疏的原则,对碱性橙 II 纯度标准物质稳定性进行了长期稳定性考察,为期 30 个月。考察稳定性采用液相色谱法,应用面积归一化法,在不同的时间间隔内进行比对测量。每次随机抽取 3 瓶样品进行平行测量,取平均值作为稳定性考察结果。

2) 短期稳定性. 为了考察运输条件对标准物质的稳定性影响,并综合考虑到南方的高温天气,实验模拟了运输条件,随机抽取 6 瓶样品,分别置于运输条件下 $((60\pm 5)$  °C,培养箱中)和常规储存条件下 $((4\pm 1)$  °C)保存一个星期,对比两种不同条件对其稳定性影响(以测量温度 60 °C 为例)。

## 2 结果与分析

### 2.1 定性分析

分别采用傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、高分辨质谱法和核磁共振 H 谱对碱性橙 II 纯度标准物质候选物进行定性分析<sup>[18]</sup>,实验所得谱图及与标准谱图 SDBS 进行对比。图 1 给出了不同波长  $\lambda$  下碱性橙 II 纯度标准物质候选物的透射率  $T$ ,从图 1 中可以找到位于  $1\ 250\sim 1\ 750\ \text{cm}^{-1}$  的芳环特征骨架振动和 N,N 双键振动。图 2 中  $\delta = 4.79$  为溶剂重水中氢的峰。谱图积分为 9 个氢(不包括 HCl),结构上为 8 个氢,可见候选物 1H-NMR 与碱性橙 II 的结构吻合。在高分辨质谱中可以找到  $m/z=213.114$  的分子离子峰,高分辨率质谱检索匹配度为 99.1%。3 种谱图结果证明纯度物质候选物的主要成分确为碱性橙 II。

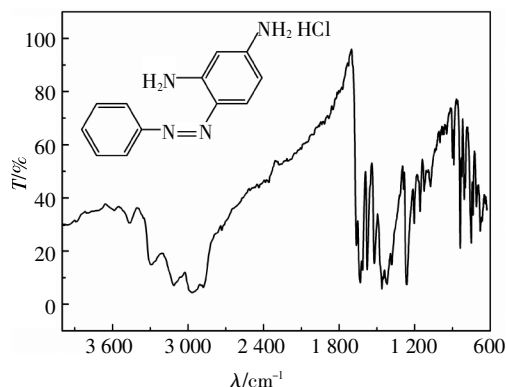


图 1 碱性橙 II 纯度候选标准物质的傅里叶变换红外光谱  
Fig.1 FTIR of the candidate basic orange II  
purity reference material

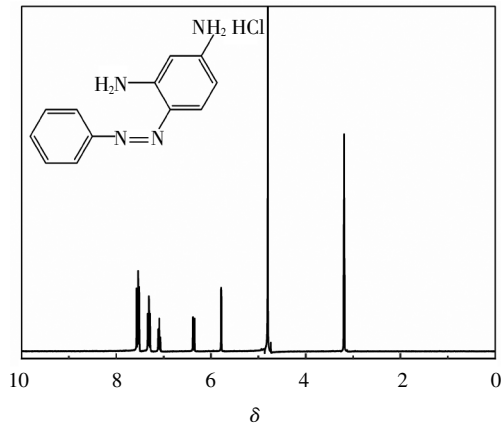


图2 碱性橙 II 纯度候选标准物质的核磁共振氢谱

Fig.2  $^1\text{H-NMR}$  of the candidate basic orange II purity reference material

## 2.2 均匀性分析

标准物质的均匀性是衡量其性能的重要指标,也是测量值准确传递的重要依据,它用来描述标准物质特性的空间分布特征.标准物质的特性量值应当是均一的,即在一定的细分范围内,特性量值保持不变.将均匀性考察的数据在 95% 的置信概率下进行方差分析,作为样品的均匀性结果<sup>[12]</sup>,计算结果列于表 1 和表 2 中.

表 1 碱性橙 II 纯度标准物质均匀性实验数据及结果

Tab.1 The homogeneity results of basic orange II purity reference material

瓶号	纯度 / %			平均
	1	2	3	
1	99.50	99.36	99.38	99.41
2	99.44	99.44	99.43	99.43
3	99.49	99.44	99.34	99.42
4	99.42	99.41	99.34	99.39
5	99.43	99.41	99.41	99.42
6	99.44	99.40	99.36	99.40
7	99.48	99.39	99.36	99.41
8	99.41	99.44	99.38	99.41
9	99.48	99.38	99.37	99.41
10	99.43	99.38	99.38	99.40
11	99.43	99.41	99.41	99.42
12	99.40	99.36	99.34	99.37
13	99.42	99.38	99.39	99.40
14	99.43	99.41	99.37	99.40
15	99.45	99.36	99.34	99.39

表 2 碱性橙 II 纯度标准物质均匀性结果方差分析

Tab.2 The homogeneity and variance analysis results of basic orange II purity reference material

差异源	SS	df	MS	F-value	P-value	F-crit
组间	0.012	14	$8.44 \times 10^{-4}$	0.408	0.961	2.037
组内	0.062	30	$2.07 \times 10^{-3}$			
总计	1.494	44				

表中:SS 为标准方差;df 为自由度;MS 为平均方差;F-value 为 F 值,用于衡量拟合显著程度;P-value 为 P 值,用于衡量组间差异大小;F-crit 为 F 临界值.

由表 2 中数据可得:

$$S_1^2 = \frac{Q_1}{v_1} = \frac{0.0118}{14} = 8.44 \times 10^{-4} \quad (1)$$

$$S_2^2 = \frac{Q_2}{v_2} = \frac{0.0621}{30} = 2.07 \times 10^{-3} \quad (2)$$

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} = \frac{8.44 \times 10^{-4}}{2.07 \times 10^{-3}} = 0.408 \quad (3)$$

$$F_\alpha(v_1, v_2) = 2.037 (\alpha = 0.05) \quad (4)$$

式中: $S_1$  为样品组间标准偏差; $S_2$  为组内标准偏差.经计算  $F < F_\alpha$ ,表明样品间不存在明显差异.

因为  $S_1^2 < S_2^2$ ,此时均匀性产生的标准偏差按下式计算:

$$S_H = \sqrt{\frac{S_2^2}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_2 S_2^2}} = \sqrt{\frac{2.07 \times 10^{-3}}{3}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{30}} = 0.013\% \quad (5)$$

方法测量的标准偏差:

$$S_2 = \sqrt{2.07 \times 10^{-3}} = 0.045\% \quad (6)$$

从计算可以看出,碱性橙 II 纯度样品测量结果的统计量 F 值小于均匀性检验临界值  $F_\alpha=2.037$ ,证明该碱性橙 II 纯度样品是均匀的.各样品瓶间的不均匀性所产生的标准偏差与方法测量的标准偏差大小相近,计算总的不确定度必须把均匀性因素考虑进去.统计方法显示,碱性橙 II 纯度标准物质均匀性良好,样品最小取样量为 10 mg.

## 2.3 稳定性检验

标准物质的稳定性是指被定值的特性量随时间变化的情况,其稳定性主要受物理、化学和保存条件等因素的影响.需要用精密度高的分析方法对其进行长时间的定期考察来确定相对的稳定期限.其中,长期稳定性是指标准物质特性随时间延续的稳定性,碱性橙 II 纯度标准物质长期稳定性详见表 3 和表 4.

表 3 碱性橙 II 纯度标准物质长期稳定性实验数据  
Tab.3 Long-term stability test of basic orange II  
purity reference material

时间/月	纯度结果 / %			
	样品 1	样品 2	样品 3	平均
1	99.49	99.46	99.48	99.48
3	99.33	99.31	99.31	99.32
6	99.79	99.79	99.78	99.79
12	99.61	99.62	99.61	99.61
18	99.28	99.24	99.26	99.26
24	99.57	99.58	99.53	99.56

表 4 碱性橙 II 纯度标准物质长期  
稳定性实验数据方差分析结果

Tab.4 Long-term stability variance analysis results  
of basic orange II purity reference material

	自由度	SS	MS	F 值	显著因子
回归分析	1	0.040	0.040	0.775	0.419
残差	5	0.260	0.052		
总计	6	0.300			

由于没有一种物理/化学模型能够真实地描述该候选标准样品的降解机理,故采用直线作为经验模型,以  $x$  代表时间,以  $y$  代表碱性橙 II 纯度标准物质的值,拟合成一条直线,则直线的斜率为:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = 7.4 \times 10^{-3} \quad (7)$$

式中:  $\bar{Y} = 99.55$ ,  $\bar{X} = 13.42$ .

截距由下式计算:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} = 99.45 \quad (8)$$

直线上的点的标准偏差由下式计算:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} = 5.2 \times 10^{-2} \quad (9)$$

取其平方根  $s = 0.2280\%$ ,斜率的不确定度为:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = 8.50 \times 10^{-3} \quad (10)$$

自由度  $f = n - 2 = 4$  和  $p = 0.95$  (95%置信水平) 的  $t$  分布因子等于 2.78.

由于  $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$ , 故斜率是不显著的. 因

而未观测到不稳定性,即表明在 30 个月内,该回归是不显著的 ( $\text{sig. } F = 0.3567 > 0.05$ ), 即碱性橙 II 纯度标准物质的量值没有发生明显的趋势性变化,这说明所采取储存条件有效地保证了碱性橙 II 纯度标准物质质量值的稳定性.

短期稳定性是指在运输条件下标准物质在运输过程中的稳定性. 碱性橙 II 纯度标准物质的短期稳定性考察结果见表 5.

表 5 碱性橙 II 纯度标准物质短期稳定性实验数据  
及方差分析结果 (60 °C)

Tab.5 Short-term stability test data and analysis  
of variance results of of basic orange II  
purity reference material (60 °C)

时间/d	纯度/%	
	常规储存条件下	运输条件下
1	99.45	99.48
2	99.58	99.51
3	99.49	99.45
4	99.61	99.59
6	99.46	99.47
方差	0.87	1

对储存条件和运输条件下的测量数据进行相同的统计分析,发现两种条件下标准物质质量值没有发生显著变化.

通过长期稳定性和短期稳定性考察,在稳定期为 30 个月内,碱性橙 II 纯度标准物质稳定性良好,量值没有发生明显变化,即储存条件和运输条件很好地保证了标准物质的稳定性.

## 2.4 质量平衡法

根据质量平衡法即扣除杂质法可得纯度为:

$$\text{纯度} = [100\% - W_{(\text{非挥发性杂质})}] \times [100\% - W_{(\text{溶剂残留})} - W_{(\text{水})} - W_{(\text{灰分})}] \times 100\% \quad (11)$$

碱性橙 II 纯度物质中主要非挥发性杂质采用气相色谱面积归一化法测定,溶剂残留采用顶空 GC 分析,水分含量由卡尔费休法测定,灼烧灰分通过对比灼烧前后样品质量的差异测量.

### 2.4.1 多家实验室联合定值(液相色谱面积归一化法)

按照“国家一级标准物质技术规范”的要求,主成分纯度采用多家实验室合作定值,所采用的定值方法为液相色谱面积归一化法. 8 家实验室定值的实验结果列于表 6 中. 我们采用狄克逊准则和格拉

布斯准则对所有数据进行可疑值分析,未发现可疑值。

表 6 碱性橙 II 纯度标准物质 8 家实验室定值结果

Tab.6 Characterization of basic orange II purity reference material in eight laboratories

实验室	纯度分析结果 / %			平均值 / %
	样品 1	样品 2	样品 3	
1	99.42	99.39	99.42	99.41
2	99.65	99.57	99.55	99.59
3	99.40	99.40	99.39	99.40
4	99.80	99.82	99.85	99.82
5	99.40	99.41	99.41	99.41
6	99.86	99.81	99.86	99.84
7	99.26	99.23	99.25	99.25
8	99.45	99.46	99.46	99.46

采用 8 家实验室的总平均值作为联合定值的结果. 总平均值如下:

$$\bar{X} = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^8 \bar{x}_i = 99.52\% \quad (12)$$

#### 2.4.2 溶剂残留测试

碱性橙 II 纯品原料在加工过程中,易残留的溶剂为乙醇<sup>[15]</sup>,采用顶空进样-气相色谱仪法对碱性橙 II 和乙醇进行测试,发现在顶空条件下,碱性橙 II 溶液中未检出乙醇等溶剂。

#### 2.4.3 水分的测定

碱性橙 II 纯度物质水分测试采用卡尔费休水分测定仪测试,重复测量 6 次,取平均值作为水分测试结果,得到结果如表 7 所示。

表 7 碱性橙 II 纯度标准物质水分含量测试结果

Tab.7 Results of moisture content in basic orange II purity reference material

测试次数	测试结果 / %	平均值 / %	R / %
1	0.15		
2	0.11		
3	0.12		
4	0.18	0.15	0.10
5	0.21		
6	0.13		

根据格拉布斯(Grubbs)准则<sup>[15]</sup>,对 6 组数据按大小重新排列,对残差最大值的 0.21 进行分析.在

概率  $P=95\%$  条件下,其残差的绝对值与实验观测数据标准偏差之比小于格拉布斯临界值,即  $\frac{|x_d - \bar{x}|}{s} <$

$G_{(0.05,6)}$ , ( $G_{(0.05,6)}$  是显著水平为 0.05, 重复观测数为 6 时的格拉布斯临界值). 表明该组数据无可疑值,所有数据保留,得到水分平均值为 0.15%。

#### 2.4.4 原料灰分测试

灰分测试是估计无机杂质总量的一种方法. 碱性橙 II 纯度灰分通过高温灼烧测得,称取适量样品,在  $(650 \pm 50)^\circ\text{C}$  的马弗炉中灼烧至恒重,称重测得碱性橙 II 纯度灰分结果,重复测量 6 次,取平均值作为实验结果,得到结果如表 8 所示。

表 8 碱性橙 II 纯度标准物质灰分测试结果

Tab.8 Results of ash content of basic orange II purity reference material

测试次数	测试结果 / %	平均值 / %	R / %
1	0.14		
2	0.18		
3	0.15		
4	0.11	0.14	0.07
5	0.12		
6	0.13		

同理,根据格拉布斯准则,对 6 组数据按大小重新排列,对残差最大值的 0.11 和 0.18 进行分析,在概率  $P=0.05$  条件下,其残差的绝对值与实验观测数据标准偏差之比小于格拉布斯临界值,即  $\frac{|x_d - \bar{x}|}{s} < G_{(0.05,6)}$ ,表明无可疑值,所有数据保留.得到灰分平均值为 0.14%。

综上,计算得到质量平衡法测得碱性橙 II 纯度值为:

$$\begin{aligned} \bar{W}_{\text{总}} &= W \times (1 - W_{\text{H}_2\text{O}} - W_{\text{灰分}}) = \\ &= 99.52\% \times (100\% - 0.15\% - 0.14\%) = \\ &= 99.2\% \end{aligned} \quad (13)$$

#### 2.5 不确定度评定

根据 JJG 1006—1994《一级标准物质研制技术规范》及 JJF 1343—2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》的规定<sup>[11,19]</sup>,明确标准值的总不确定度由 3 部分组成. 第 1 部分是碱性橙 II 定值实验引入的不确定度( $u_{\text{定值}}$ );第 2 部分是样品不均匀产生的不确定度( $u_{\text{hb}}$ );第 3 部分是样品不稳定产生的不确定度( $u_{\text{hs}}$ ).

### 2.5.1 定值引入的不确定度

多家实验室协作的定值不确定度可采用方差分析来进行估算<sup>[12]</sup>。表 9 为碱性橙 II 纯度标准物质定值结果单因素方差分析。

表 9 碱性橙 II 纯度标准物质定值结果单因素方差分析

Tab.9 The variance analysis results of characterization data of basic orange II purity reference material

差异源	SS	df	MS	F	P-value	F-crit
组间	0.961	7	0.137	224.12	9.37×10 <sup>-15</sup>	2.657
组内	0.010	16	6.3×10 <sup>-4</sup>			
总计	0.971	23				

总平均值的的不确定度计算如下：

$$s_r^2 = MS_{within} = 6.3 \times 10^{-4} \quad (14)$$

$$s_L^2 = \frac{MS_{among} - MS_{within}}{n_0} = \frac{0.1373 - 0.00063}{3} = 4.6 \times 10^{-2} \quad (15)$$

$$u_{联合} = \sqrt{\frac{s_L^2}{p} + \frac{s_r^2}{n \times p}} = \sqrt{\frac{4.6 \times 10^{-2}}{8} + \frac{6.3 \times 10^{-4}}{24}} = 0.076\% \quad (16)$$

根据水分测量的数据,测定的  $R=0.1\%$ ,  $n=6$  (查表  $c=2.53$ ), 采用极差法计算水分引入的不确定度分量为:  $u_{H_2O} = R/c = 0.04\%$ 。

根据灰分测量的数据,测定的  $R=0.07\%$ ,  $n=6$  (查表  $c=2.53$ ), 采用极差法计算灰分引入的不确定度分量为:  $u_{灰分} = R/c = 0.03\%$ 。

因此定值引入总的的不确定度为:

$$u_{定值} = \sqrt{u_{联合}^2 + u_{H_2O}^2 + u_{灰分}^2} = \sqrt{0.08\%^2 + 0.04\%^2 + 0.03\%^2} = 0.094\% \quad (17)$$

### 2.5.2 均匀性产生的标准不确定度( $u_{bb}$ )

由均匀性部分计算结果可知,样品瓶间不均匀性所产生的标准偏差必须并入到总的的不确定度中。因此,样品间不均匀的标准偏差为:

$$S_H = \sqrt{\frac{s_2^2}{n}} \cdot \sqrt{\frac{2}{v s_2^2}} = 0.013\% \quad (18)$$

$$u_{bb} \approx 0.013\%$$

### 2.5.3 稳定性引入的不确定度( $u_{lis}$ )

根据碱性橙 II 长期稳定性的实验数据(表 3)及回归方差结果(表 4)可知,有效期  $t=30$  个月的长期稳定性的不确定度贡献为:

$$u_{lis} = s_b \cdot t = 8.5 \times 10^{-3} \times 30 = 0.255\% \quad (19)$$

### 2.5.4 标准物质总的的不确定度

$$u_{总} = \sqrt{u_{定值}^2 + u_{均匀性}^2 + u_{稳定性}^2} = \sqrt{0.094\%^2 + 0.013\%^2 + 0.123\%^2} = 0.272\% \quad (20)$$

扩展不确定度:

$$U_{95} = k \times u_{总} = 2 \times 0.272\% = 0.54\% \approx 1.0\% \quad (21)$$

碱性橙 II 纯度标准物质的定值结果为:

$$W = (99.2 \pm 1.0)\%, k = 2 \quad (22)$$

## 3 结论

本文对碱性橙 II 纯度标准物质的均匀性和稳定性进行了充分研究,多家实验室参与了纯度值的联合测定。这一系列数据已成功应用于实际样品的测量,并且取得了令人满意的结果。该样品已申报国家二级标准物质并获批,其标准物质编号为:GBW(E)100372。该标准物质可以满足食品、医药、日常化学品、环保、化学产品研究和测试需求,也将用于对相关仪器(例如比色板、荧光分光光度计等)校准和分析方法的评估。

致谢:感谢安捷伦科技(中国)有限公司广州分公司、广东省兽药饲料质量检验所、东莞市食品药品检验所、东莞市水务监测中心、广东中测食品化妆品安全评价中心有限公司、中国广州分析测试中心、广东产品质量监督检验研究院食品检验室等 8 家实验室对样品进行了联合定值。

## 参考文献

- [1] 郑月明, 国伟, 聂雪梅, 等. 食品中违禁添加的非食用色素检测技术综述[J]. 中国农学通报, 2012, 28(9): 222—228. ZHENG Y M, GUO W, NIE X M, et al. Research on detection methods of inedible pigment illegally added to food[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(9): 222—228. (In Chinese)
- [2] ZOU T T, HE P L, Amangul Y S, et al. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1742—1748.
- [3] MA M, LUO X B, CHEN B, et al. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection—

- electrospray mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1103(1):170—176.
- [4] 王玉枝,童玲,崔玥,等.微波萃取气相色谱法测定大米中的有机磷农药[J].*湖南大学学报(自然科学版)*,2007,34(2):64—66. WANG Y Z,TONG L,CUI Y,*et al.* Determination of organophosphorus pesticides in rice by microwave-assisted extraction/gas chromatography [J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*,2007,34(2):64—66.(In Chinese)
- [5] 周瑾艳,陈玲,毛沅文,等.罗丹明 B 纯度标准物质的研制[J].*化学分析计量*,2016,25(4):4—7. ZHOU J Y,CHEN L,MAO Y W,*et al.* Development of rhodamine B certified reference material [J]. *Chemical Analysis and Meterage*,2016,25(4):4—7. (In Chinese)
- [6] 吴方迪,倪晓丽.苋菜红,胭脂红,柠檬黄,亮蓝,日落黄五种食用合成色素标准物质[J].*现代测量与实验室管理*,1994(2):26—28. WU F D,NI X L. Certified Reference materials of synthetic dye-stuff for food additive amaranth,ponceau 4R,tartrazine,brilliant blue and sunset yellow[J]. *Modern Measurement & Test*,1994(2):26—28. (In Chinese)
- [7] KORHAMMER S,HERZIG R,SCHRAMMEL P,*et al.* The preparation of a cabbage reference material for environmental monitoring and food analysis [J]. *Accreditation & Quality Assurance*,2000,5(6):238—242.
- [8] 黄雅佩,吴官非,夏焜,等.高效液相色谱法测定鱼肉中的碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 两种工业染料 [J]. *化学试剂*,2013,35(5):435—438. HUANG Y P,WU G F,XIA K,*et al.* Determination of chrysoidin II and auramine O in fish via high performance liquid chromatography [J]. *Chemical Reagents*,2013,35(5):435—438.(In Chinese)
- [9] 孙稚菁,王灵芝,任国杰,等. QuEChERS-HPLC-MS/MS 快速测定染色黄鱼中 3 种碱性橙类染料 [J]. *食品研究与开发*,2017,38(12):143—146. SUN Z J,WANG L Z,REN G J,*et al.* Determination of 3 basic Orange in Dyed Yellow Croaker by QuEChERS-High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Research and Development*,2017,38(12):143—146.(In Chinese)
- [10] 曹鹏,乔旭光,娄喜山,等.固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料 [J]. *分析化学*,2011,39(11):1670—1675. CAO P,QIAO X G,LOU X S,*et al.* Simultaneous determination of 6 industrial dyes in foods by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*,2011,39(11):1670—1675. (In Chinese)
- [11] JJF 1006—1994 一级标准物质研制技术规范[S].北京:中国计量出版社,1995:1—22. JJF 1006—1994 Technical norm of primary reference materials [S].Beijing: China Metrology Publishing House,1995:1—22. (In Chinese)
- [12] ISO 17034 General requirements for the competence of reference material producers [S]. London:British Standards Institution Standards Limited,2016:1—24.
- [13] ISO Guide 35 Reference materials-general and statistical principles for certification [S].London:British Standards Institution Standards Limited,2017:1—105.
- [14] 李文辉,李宛妍,李俊毅.高效液相色谱法测定食品中 3 种碱性橙含量[J].*理化检验(化学分册)*,2011,47(7):768—770. LI W H,LI Z Y,LI J Y,*et al.* HPLC determination of 3 alkali orange dyestuffs in foodstuffs [J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Chemical Analysis)*,2011,47(7):768—770. (In Chinese)
- [15] 陈伟,乔勇升,武婧.固相萃取-反相高效液相色谱法测定汤料中的碱性橙 II[J].*中国食品添加剂*,2017(1):169—172. CHEN W,QIAO Y S,WU Q. Determination of basic orange II in soup stock by solid-phase extraction coupled with reversed-phase high performance liquid chromatography[J].*China Food Additives*,2017(1):169—172.(In Chinese)
- [16] 刘红玉,陈梦现,欧阳明,等.高效液相色谱检测番茄与土壤中的吩胺霉素残留 [J]. *湖南大学学报(自然科学版)*,2016,43(12):128—133. LIU H Y,CHEN M X,OU Y M,*et al.* Determination of new pesticide phenazine-carboxamide residue in tomato and soil by HPLC with DAD [J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*,2016,43(12):128—133.(In Chinese)
- [17] SIDDIQI M R,SINGH R,BHATNAGAR A,*et al.* Determination of residual solvents in docetaxel by headspace gas chromatography [J]. *Arabian Journal of Chemistry*,2013,36(S2):479—484.
- [18] 肖苏尧,王俊亮,陈运娇,等.桉叶中 2 种没食子单宁结构鉴定及其抗氧化研究 [J]. *湖南大学学报(自然科学版)*,2012,39(5):73—76. XIAO S Y,WANG J L,CHEN Y J,*et al.* Two tautomerizing galotannins from eucalyptus leaves: purification, structure, characterization and their antioxidant activity[J]. *Journal of Hunan University(Natural Sciences)*,2012,39(5):73—76.(In Chinese)
- [19] JJF 1343—2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[S].北京:中国质检出版社,2012:1—61. JJF 1343—2012 General and statistical principles for characterization for reference materials[S]. Beijing: China Zhijian Publishing House,2012:1—61. (In Chinese)