

液相色谱-串联质谱法测定婴儿奶粉中三聚氰胺残留量的不确定度评估

邹游*, 蓝草, 欧阳少伦, 邵琳智, 林峰
(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要: **目的** 对液相色谱-串联质谱法测定婴儿奶粉中的三聚氰胺的不确定度进行评估。**方法** 以 GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》为基础改良方法, 测定婴儿奶粉中的三聚氰胺。依据 CNAS-GL06: 2006《化学分析中不确定度的评估指南》, 通过数学建模建立不确定度来源鱼骨图, 分析不确定度来源并计算不确定度分量。**结果** 当奶粉中的三聚氰胺残留量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 测量不确定度为 3.70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$), 其中液质仪器校准、重现性和偏差对不确定度影响最大。**结论** 内标法的线性拟合对测量不确定度贡献较小, 对三聚氰胺的常规检测具有重要意义。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 婴儿奶粉; 三聚氰胺; 内标法; 不确定度

Uncertainty evaluation for the determination of melamine residues in infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZOU You*, LAN Cao, OUYANG Shao-Lun, SHAO Lin-Zhi, LIN Feng

(Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of melamine residue in infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Based on GB/T 22388-2008 *Determination of melamine in raw milk and dairy products*, the original method to measure melamine residue in infant formula was improved. According to CNAS-GL06: 2006 *Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis*, the sources of uncertainty of the whole determination procedure were analyzed and calculated based on the mathematical model and fishbone diagram. **Results** When melamine residue in infant formula was 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the uncertainty of measurement was 3.70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$), and the major sources of uncertainty of measurement were the calibration of LC-MS/MS, repeatability and measuring deviation. **Conclusions** Standard curve fitting by internal standard method contributes little in combined uncertainty, which is significant for conventional detection of melamine.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; infant formula; melamine; internal standard method; uncertainty

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技项目(2015GDK24)

Fund: Supported by Scientific and Technical Project of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (2015GDK24)

*通讯作者: 邹游, 助理工程师, 主要研究方向为食品兽药残留及非法添加物分析。E-mail: yo.zou@qq.com

*Corresponding author: ZOU You, Assistant Engineer, Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China. E-mail: yo.zou@qq.com

1 引言

化学定量分析结果是很多重要决策的基础,通过度量结果的可信度来证明其适宜性,是目前要求测量结果溯源至所定义标准必不可少的一步。而度量测定结果可信度的通行方法就是在测定结果中附加测量不确定度的表述^[1]。《测量不确定度评定与表示》^[2]采用当前国际通行的观点与方法,使涉及测量的技术领域和部门,可以用统一的准则对测量结果及其质量进行评定、表示和比较。基于不同学科之间交往以及全球化市场经济发展的需要,我国对不确定度的评估也愈加重视,并规定检测实验室必须建立测量不确定度的评估程序,要求其有能力对每一项有数值要求的测量结果进行测量不确定度评定^[3]。

近几年,在我国发生的重大食品安全事故中,三聚氰胺事件影响较大。三聚氰胺俗称密胺、蛋白精,进入体内后几乎不能被代谢,它会在身体内与氰尿酸结合生成晶体状聚合物,从而引起肾结石、膀胱结等症状,严重危害人的身体健康^[4]。自2009年爆发“三鹿”奶粉事件后,食品尤其是原料乳和乳制品中的三聚氰胺检测成为新常态。目前关于三聚氰胺不确定度报告均以GB/T 22388-2008^[5]为实验方法,使用液相色谱法或液质联用法进行外标法定量后再评估其不确定度。本研究采用液质联用法测定并以内标法定量改进婴儿奶粉中的三聚氰胺残留量的测定,并对其不确定度来源进行分析与评估。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

QTRAP 4000 复合型三重四极杆/线性离子阱质谱(配备电喷雾离子源,购自AB SCIEX公司);Analyst 仪器控制及数据处理软件,UFLC-XR 岛津液相色谱仪(包括输液泵LC-20AD,自动进样器SIL-20AC,柱温箱CTO-20AC,购自日本岛津公司),BT223S型电子天平(德国Sartorius公司),200 μL和1 mL可调微量移液器(德国吉尔森公司),HR-XC 3cc(60 mg)小柱(北京振翔公司)。

三聚氰胺标准品(纯度99.5%,Dr. Ehrenstorfer公司);内标物:Melamine-¹⁵N₃(TRC Inc.公司)

三氯乙酸(分析纯,北京振翔公司);乙腈、甲醇(色谱级,美国Fisher公司);甲酸胺(质谱纯,美国Fisher公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

标准储备液:称取10 mg标准物质到25.00 mL容量瓶,定容。

标准中间液:从标准储备液中准确吸取0.625 mL至25.00 mL容量瓶,定容。

标准混合工作液:从标准中间液中准确吸取2.5 mL

至25.00 mL容量瓶,定容。

环境条件:室温20~28℃,相对湿度70%。

2.2.2 样品前处理

(1) 提取:称取2.00 g(±0.01 g)样品,置于50 mL具塞离心管,加入内标,加1%三氯乙酸溶液15 mL,充分振摇,再加入25 mL乙腈继续振摇沉淀蛋白,离心5 min,取清液4 mL加入2 mL正己烷脱脂后取下层液体待净化。

(2) 净化:固相萃取柱依次用3 mL甲醇和3 mL 0.1 mol/L盐酸活化,取3 mL待净化液过柱,依次用3 mL 0.1 mol/L盐酸和甲醇淋洗,用4 mL 5%氨水甲醇洗脱,并收集。

(3) 浓缩、定容:洗脱液于50℃下氮气吹干,用0.75 mL流动相定容,涡旋混合1 min后,用0.45 μm微孔滤膜过滤待检测。

2.3 仪器条件

色谱柱:Waters Atlantis HILIC Silica (4.6 mm x 100 mm, 3 μm);柱温为40℃;进样体积为5 μL;流动相为乙腈-5 mmol/L甲酸胺(8:2, V:V);等度洗脱5 min;流速为0.35 mL/min;离子化模式为电喷雾正离子模式(positive ions electrospray, ESI⁺);扫描方式为多反应检测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。

3 结果与讨论

根据实验结果,进行不确定度评估。

3.1 建立数学模型

$$X = \frac{C \times V \times D}{m \times f_r} \times f_Q$$

式中,X:样品中被测组分的质量分数,μg/kg;C:回归方程拟合得到的样品溶液质量浓度,μg/mL;V:样液最终定容体积,mL;m:样品的质量,g;D:稀释因子,本方法中D=10,由曲线的内标浓度与样品的内标浓度决定;f_r:重现性和偏差影响因子,由方法规定其值为1;f_Q:液质联用仪定量校正影响因子,由方法规定其值为1。

3.2 不确定度来源及其评定

根据三聚氰胺含量计算函数关系式,判断测量结果的不确定度来源包括回归方程拟合得到的样品溶液质量浓度C;样液最终定容体积V;样品的质量m;重现性和偏差影响因子f_r;液质联用仪定量校正影响因子f_Q。各不确定度分量来源详见下图:

3.2.1 标准曲线定量引入的不确定度u_{rel(c)}

包括标准物质纯度、称重、定容、稀释及标准曲线拟合等所带来的不确定度。

3.2.1.1 标准物质纯度的不确定度

三聚氰胺标准物质证书标明的纯度为99.5%,给出的扩展不确定度U为0.5%,属于正态分布,对于大约95%的

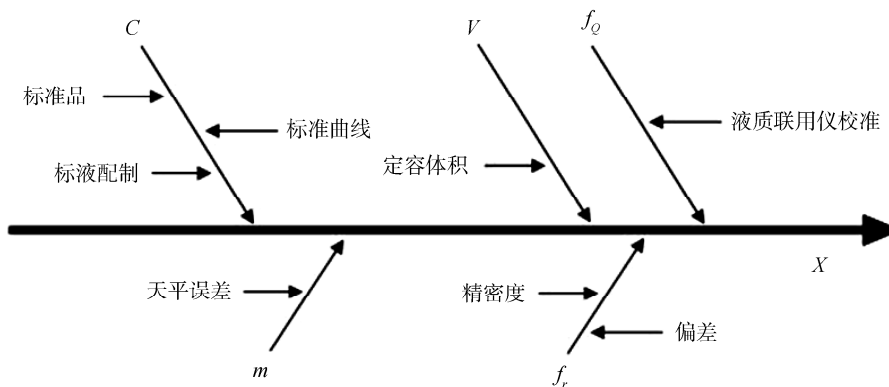


图 1 不确定度分量来源图
Fig.1 Graph of uncertainty component sources

置信水平, 包含因子 k 值为 2。按 B 类评定, 其相对不确定度:

$$u_1 = \frac{U}{k} = \frac{0.5\%}{2} = 0.25\%$$

$$u_{1rel} = \frac{u_1}{P} \times 100\% = \frac{0.25}{99.5} \times 100\% = 0.25\%$$

3.2.1.2 标准物质称重引起的不确定度

精度为 0.01 mg 的天平计量检定证书给出的是其扩展不确定度为 0.05 mg, 属于正态分布, 对于大约 95% 的置信水平, 包含因子 k 值为 2。

称重 10 mg, 按 B 类评定, 其相对不确定度:

$$u_2 = \frac{U_x}{k} = \frac{0.05}{2} = 0.025$$

$$u_{2rel} = \frac{u_2}{m_x} = \frac{0.025}{10} \times 100\% = 0.25\%$$

3.2.1.3 标准溶液(母液)引起的不确定度

包括容量瓶误差、定容至刻度变动性及温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

25.00 mL 容量瓶:

A 级容量瓶允差为 ± 0.00004 mL, 属于矩形分布, 按 B 类评定,

$$u_{3(1)} = \frac{0.00004}{\sqrt{3}} = 0.000023$$

容量瓶定容变异系数为 0.00024, $u_{3(2)}$ = 容量瓶体积 \times 定容变异系数 = $25.00 \times 0.00024 = 0.0060$

实验室温度变化为 ± 3 °C, 甲醇在 20 °C 的体积膨胀系数为 0.0011 °C⁻¹, 属于正态分布, 则 95% 置信概率时 ($K=1.96$) 体积变化区间为 $\pm(25.00 \times 3 \times 0.0011) = \pm 0.082$ mL, 转换成标准偏差即:

$$u_{3(3)} = \frac{0.082}{1.96} = 0.042$$

故标准溶液(母液)引起的相对不确定度为:

$$u_{3rel} = \frac{\sqrt{u_{3(1)}^2 + u_{3(2)}^2 + u_{3(3)}^2}}{V} \times 100\% = 0.17\%$$

3.2.1.4 标准溶液(中间液)引起的不确定度

包括容量瓶误差、定容至刻度变动性及温度不同引起的体积差异所带来的不确定度以及 200 μ L 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

同理标准溶液(中间液)由 25.00 mL 容量瓶引起的相对不确定度为:

$$u_{4容rel} = 0.17\%$$

200 μ L 移液枪:

容量允差为 ± 1.33 μ L, 属于矩形分布, 按 B 类评定,

$$u_{4(1)} = \frac{1.33}{\sqrt{3}} = 0.77$$

实验室温度变化为 ± 3 °C, 甲醇在 20 °C 的体积膨胀系数为 0.0011 °C⁻¹, 属于正态分布, 则 95% 置信概率时 ($K=1.96$) 体积变化区间为 $\pm(100 \times 3 \times 0.0011) = \pm 0.33$ μ L, 转换成标准偏差即:

$$u_{4(2)} = \frac{0.33}{1.96} = 0.17$$

标准溶液(中间液)由移液枪引起的相对不确定度为:

$$u_{4移rel} = \frac{\sqrt{u_{4(1)}^2 + u_{4(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.79\%$$

故标准溶液(中间液)引起的相对不确定度为:

$$u_{4rel} = \sqrt{u_{4容rel}^2 + u_{4移rel}^2} \times 100\% = 0.80\%$$

3.2.1.5 标准溶液(混合工作液)引起的不确定度

包括容量瓶误差、定容至刻度变动性及温度不同引起的体积差异所带来的不确定度以及 1000 μ L 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

同理标准溶液(混合工作液)由 25.00 mL 容量瓶引起的相对不确定度为:

$$u_{5容rel} = 0.17\%$$

1000 μ L 移液枪:

容量允差为 ± 4.44 μ L, 属于矩形分布, 按 B 类评定,

$$u_{5(1)} = \frac{4.44}{\sqrt{3}} = 2.56$$

实验室温度变化为±3 °C，甲醇在 20 °C 的膨胀系数为 0.0011 °C⁻¹，属于正态分布，则 95%置信概率时(K=1.96)体积变化区间为±(500×3×0.0011) = ±1.65 μL，转换成标准偏差即：

$$u_{5(2)} = \frac{1.65}{1.96} = 0.84$$

故标准溶液(混合工作液)由移液枪引起的相对不确定度为：

$$u_{5\text{移rel}} = \frac{\sqrt{u_{5(1)}^2 + u_{5(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.54\%$$

故标准溶液(混合工作液)引起的相对不确定度为：

$$u_{5\text{rel}} = \sqrt{u_{5\text{容rel}}^2 + u_{5\text{移rel}}^2} \times 100\% = 0.56\%$$

3.2.1.6 标准溶液内标加入引起的不确定度

包括 200 μL 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

故标准溶液内标加入同标准溶液(中间液)由移液枪部分引起的相对不确定度，为：

$$u_{6\text{rel}} = \frac{\sqrt{u_{6(1)}^2 + u_{6(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.79\%$$

3.2.1.7 最小二乘法拟合曲线的不确定度

测定 5 个浓度水平的标准溶液，得到相应的待测物峰面积与内标峰面积的比值，详见表 1。用最小二乘法拟合得到直线方程 Y=a+bX

表 1 最小二乘法拟合标准曲线结果

Table 1 Results of the least squares fitting standard curve

x(μg/mL)	x _{pred} (μg/mL)	y _{obs}	y
1	1.02	0.380744	0.38022
2	1.97	0.6941432	0.69467
5	5.00	1.6969697	1.6976
10	10.3	3.4468085	3.4519
20	19.9	6.61605	6.6295

$$Y=0.331X+0.0426 (r=0.9998)$$

*表中 x_{pred} 为拟合得到的化合物浓度值；y_{obs} 为待测物峰面积与内标峰面积比值；y 为回归值

对样品液进行 3 次测定，由直线方程求得平均质量浓度 $\bar{x}_{\text{pred}} = 7.64 \mu\text{g/kg}$ ，则 x_{pred} 的标准不确定度为：

$$u(x_{\text{pred}}) = \frac{S(y)}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x}_{\text{pred}} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_{\text{pred}_i} - \bar{x}_{\text{pred}})^2}}$$

$$S(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{\text{obs}} - y)^2}{n-2}}$$

式中，u(x_{pred})：最小二乘法拟合曲线引入的不确定度；S(y)：标准溶液待测物质信号残差的标准差(贝塞尔公式)；P：样品溶液测定次数；n：标准溶液测定次数；a：截距；b：斜率；x_{pred}：样品溶液中待测物质的含量； \bar{x} ：标准溶液中待测物质含量的测定平均值；x_{pred_i}：标准溶液各点的待测物质含量；y_{obs}：标准溶液各点的待测物质信号响应值；y：根据标准曲线计算得到的待测物质信号响应回归值

其中，a=0.331，b=0.0426，P=3，n=6， $\bar{x} = 5 \mu\text{g/kg}$ ，则 S(y)=0.00832，u₇=0.0189μg/kg，

$$u_{7\text{rel}} = u_7 / \bar{x}_{\text{pred}} \times 100\% = \frac{0.0189}{7.638} \times 100\% = 0.247\%$$

故标准曲线定量引起的相对不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(c) = \sqrt{u_{1\text{rel}}^2 + u_{2\text{rel}}^2 + u_{3\text{rel}}^2 + u_{4\text{rel}}^2 + u_{5\text{rel}}^2 + u_{6\text{rel}}^2 + u_{7\text{rel}}^2} = 1.34\%$$

3.2.2 样品称量的不确定度 u_{rel}(m)

3.2.2.1 取 样

样品采用 GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺的检测方法》^[6]测定，所用待测样品为某品牌原装婴儿奶粉，可认为样品是均匀的、代表性充分，由此所致的不确定度忽略不计。

3.2.2.2 称 重

精度为 0.01 g 的天平计量检定证书给出的扩展不确定度 U_m 为 0.03 g，属于正态分布，对于大约 95%的置信水平，包含因子 k 值为 2，称重 2.00 g，按 B 类评定，其相对不确定度：

$$u(m) = \frac{U_m}{k} = \frac{0.03}{2} = 0.015$$

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.015}{2.00} \times 100\% = 0.75\%$$

3.2.3 重现性和偏差引入的不确定度 u_{rel}(f_r)

3.2.3.1 精密度研究

在样品中添加 0.5 μg/kg 的混合标准工作液，做 6 个平行样品测定三聚氰胺的回收率(见表 2)。

$$\text{标准不确定度为: } u(f_{r1}) = \frac{2.68}{\sqrt{6}} \times 100\% = 1.09\%$$

相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(f_{r1}) = \frac{u(f_{r1})}{f_{r1}} = \frac{1.09\%}{84.23\%} \times 100\% = 1.27\%$$

3.2.3.2 偏差引入

分析程序的偏差是通过在实验室内部确认研究中使用标准添加样品来进行研究的**错误！未定义书签。**。因此方法的稀释倍数过大，故需要尽量多次的回收率数据。将收集监控的连续 15 个批次的标准添加回收结果统计见表 3。

故重现性和偏差引起的相对不确定度为：

表 2 三聚氰胺的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

Table 2 Recoveries and RSD of melamine (n=6)

	平行测定次数						平均回收率 \bar{f}_{r1} /%	相对标准偏差 /%
	1	2	3	4	5	6		
回收率/%	86.46	87.06	85.26	82.06	81.86	82.66	84.23	2.68

表 3 三聚氰胺标准添加回收率
Table 3 Recoveries of melamine spiked

检测日期	2015.1.6	2015.1.29	2015.2.26	2015.3.26	2015.4.24
回收率	103.8	92.8	103.0	103.0	107.0
检测日期	2015.5.15	2015.6.12	2015.7.3	2015.7.22	2015.8.14
回收率	109.6	111.4	94.2	100.4	98.4
检测日期	2015.9.8	2015.10.13	2015.11.6	2015.11.26	2015.12.17
回收率	101.6	104.4	108.4	106.5	109.8
平均回收率(\bar{f}_{r2})/%	104.4				
标准偏差(SD)	4.63				
相对标准偏差(RSD)/%	4.44				
偏差引入的不确定度 $u(f_{r2})$	1.15				
偏差引入的相对不确定度/% $u_{rel}(f_{r2})=u(\bar{f}_{r2})/\bar{f}_{r2}$	1.10				

表 4 信噪比结果
Table 4 Results of signal to noise ratio

	1	2	3	4	5	6
信噪比比值 Z	0.581	0.611	0.594	0.575	0.561	0.602
信噪比比值的平均值 \bar{z}	0.588					

$$u_{rel}(f_r) = \sqrt{u_{rel}^2(f_{r1}) + u_{rel}^2(f_{r2})} = 1.67\%$$

$$u_{V2rel} = \frac{\sqrt{u_{V2(1)}^2 + u_{V2(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.79\%$$

3.2.4 定容体积的不确定度 $u_{rel}(V)$

3.2.4.1 样品溶液内标加入引起的不确定度

包括 200 μL 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

$$200 \mu\text{L} \text{ 移液枪(同上): } u_{V1(1)} = \frac{1.33}{\sqrt{3}} = 0.77$$

$$\text{温度变化(同上): } u_{V1(2)} = \frac{0.33}{1.96} = 0.17$$

故标准溶液内标加入引起的相对不确定度为:

$$u_{V1rel} = \frac{\sqrt{u_{V1(1)}^2 + u_{V1(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.79\%$$

3.2.4.2 样品溶液标准工作液加入引起的不确定度

包括 200 μL 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

同上, 标准工作液加入引起的相对不确定度为:

3.2.4.3 样品溶液定容引起的不确定度

包括 1000 μL 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

1000 μL 移液枪:

容量允差为 $\pm 4.44 \mu\text{L}$, 属于矩形分布, 按 B 类评定,

$$u_{V3(1)} = \frac{4.44}{\sqrt{3}} = 2.56$$

实验室温度变化为 $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, 水溶液在 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 的膨胀系数为 $0.0002 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, 属于正态分布, 则 95% 置信概率时($K=1.96$) 体积变化区间为 $\pm(750 \times 3 \times 0.0002) = \pm 0.45 \mu\text{L}$, 转换成标准偏差即:

$$u_{V3(2)} = \frac{0.45}{1.96} = 0.23$$

样品溶液定容引起的相对不确定度为:

$$u_{V3rel} = \frac{\sqrt{u_{V3(1)}^2 + u_{V3(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.34\%$$

故样品定容体积的相对不确定度为:

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{V1rel}^2 + u_{V2rel}^2 + u_{V3rel}^2} = 1.16\%$$

3.2.5 液质仪器校准引起的不确定度^[7]

参照 JJF 1317-2011《液相色谱-质谱联用仪校准规范》^[6]用 5 μg/L 的三聚氰胺标准溶液和 5 μg/L 的内标溶液对液质联用仪进行校准, 连续进样 6 次, 每次进样体积为 5 μL, 信噪比比值结果见表 4。

实验标准偏差 $s=0.032$ 。其中测量重复性为 A 类不确定度, 其他为 B 类不确定度。

3.2.6 测量重复性 u_{rA}

测量重复性可以通过计算 6 次测量平均值的相对标准偏差得到:

$$u_{rA} = \frac{s}{\sqrt{6}} \times \frac{1}{\bar{z}} \times 100\% = \frac{1}{\sqrt{6}} \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^6 (z_j - \bar{z})^2}{6-1}} \times \frac{1}{\bar{z}} \times 100\% = \frac{0.032}{\sqrt{6}} \times \frac{1}{0.588} \times 100\% = 2.19\%$$

式中, \bar{z} : 三聚氰胺与其内标信噪比测量结果的比值, 为 6 次测量的平均值; z_j : 第 j 次测量的信噪比比值; j : 测量次数; S : 实验标准偏差。

3.2.7 溶液标准物质浓度的相对不确定度 $u_r(c)$

包括前面标准溶液配制所带来的所有误差以及稀释至 5 μg/L 时 200 μL 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度以及内标溶液稀释至 5 μg/L 时 200 μL 移液枪误差、温度不同引起的体积差异所带来的不确定度。

同理, 标准工作液加入引起的相对不确定度为:

$$u_{8rel} = \frac{\sqrt{u_{8(1)}^2 + u_{8(2)}^2}}{V} \times 100\% = 0.79\%$$

内标溶液加入引起的相对不确定度为: $u_{9rel}=0.79\%$

故溶液标准物质浓度的相对不确定度:

$$u_r(c) = \sqrt{u_{1rel}^2 + u_{2rel}^2 + u_{3rel}^2 + u_{4rel}^2 + u_{5rel}^2 + u_{8rel}^2 + u_{9rel}^2} = 1.54\%$$

3.2.8 进样体积的相对不确定度

采用的进样量 $V=5 \mu\text{L}$ 。

容量允差为 $\pm 0.015 \mu\text{L}$, 属于矩形分布, 按 B 类评定,

$$u_r(V) = \frac{0.015}{\sqrt{3} \times 5} \times 100\% = 0.17\%$$

3.2.9 噪声强度测量的不确定度 $u_r(Hn)$

噪声强度的 A 类不确定度已经在“测量重复性”中计算, 该项为噪声强度的 B 类不确定度。在实际计算中, 将谱图放大后从软件上读取噪声强度, 该项不确定度极小,

可忽略。

故液质仪器校准引起的不确定度:

$$u_{rel}(f_Q) = \sqrt{u_r^2(A) + u_r^2(c) + u_r^2(V)} = 2.68\%$$

3.3 不确定度分量列表

根据上述分析, 列出不确定度分量列表, 见表 5。

表 5 三聚氰胺测量不确定度分量表
Table 5 Measurement uncertainty component of melamine

分量类别	来源	u_{rel}
$u_{rel}(c)$	标准曲线定量	1.34%
$u_{rel}(m)$	样品称量	0.75%
$u_{rel}(f_r)$	重现性和偏差	1.67%
$u_{rel}(V)$	定容体积	1.16%
$u_{rel}(f_Q)$	液质仪器校准	2.68%

3.4 相对合成标准不确定度

$$u_{Xrel} = \sqrt{[u_{rel}(c)]^2 + [u_{rel}(m)]^2 + [u_{rel}(V)]^2 + [u_{rel}(f_Q)]^2 + [u_{rel}(f_r)]^2} = 3.70\%$$

3.5 相对扩展不确定度

在 95% 置信区间, 取包含因子 $k=2$, 三聚氰胺的测定含量相对扩展不确定度为:

$$U_{Xrel} = k \times u_{Xrel} = 2 \times 3.70\% = 7.40\%$$

3.6 计算实例

某品牌婴儿奶粉, LC-MS/MS 测量三聚氰胺的含量结果为 50 μg/kg, 经考虑其测量不确定度为 50 μg/kg \times 7.40% = 3.70 μg/kg, 所以其结果表达为 50 μg/kg \pm 3.70 μg/kg。

4 讨论

样品的提取净化步骤因缺少量化指标, 其对不确定度的贡献无法通过 B 类不确定度进行评估, 但其影响已在“偏差引入的不确定度”中有所计算。

由图 2 可知, 本方法中液质仪器所带入的不确定度分量贡献最大, 分析其原因可能是由于液质仪器中质谱离子化的不稳定以及仪器本身的系统误差引起, 属于正常范围内误差。不同实验室所用的液质仪器不相同, 故本实验所用仪器的误差仅供参考。

本方法中重现性与偏差带入的不确定度分量贡献为其次, 分析原因可能是由固相萃取的净化效率引起的误差, 由于有内标作为校正项, 故已把误差同步校正。且此方法在常规检测中的过柱净化步骤应用了批量操作仪器-自动固相萃取仪, 故已把因人为操作所带入的误差大大减低。

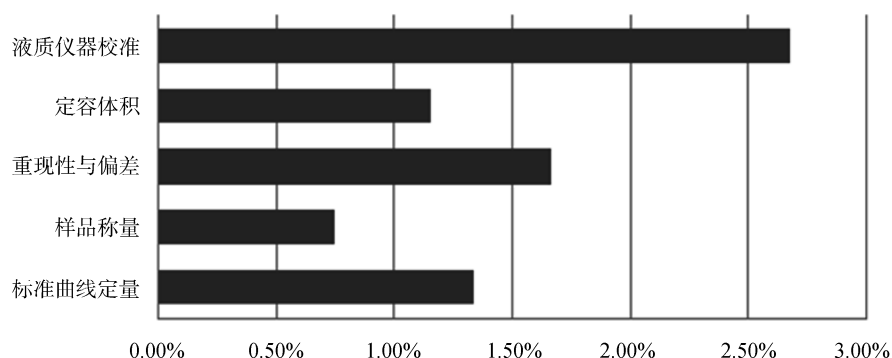


图2 三聚氰胺测量不确定度分量贡献对比

Fig.2 Contribution degree of measurement uncertainty component of melamine

本实验室的三聚氰胺检测为常规项目,每次实验监测质控数据,且保证均在质量准则范围内的波动。根据CNAS-GL06^[1]中7.12.3的描述,统计了一年内45个批次的质控数据,计算出其偏差引入的相对不确定度为0.74%,低于本研究的合成不确定度值,符合指南中“由随机影响产生的合成不确定度不可能小于质量保证测量的标准偏差”的结论,说明使用本方法对于实际做样品意义较大。

本方法中标准曲线定量带入的不确定度虽然占合成不确定度的36%,但其值相对其他同类方法的不确定度较小,说明本方法标准所使用的标准物以及中间涉及的标准液配制和标准曲线的拟合均比较优越。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL06: 2006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-GL06: 2006. Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [2] JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059-1999 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [3] 陈祝康, 杨美成, 陆明, 等. LC-MS/MS 法测定猪肝中盐酸克仑特罗残

留量的不确定度评估[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(6): 475-479.

Chen Z K, Yang M C, Lu M, *et al.* Evaluation of the uncertainty in determination of clenbuterol hydrochloride residue in pork liver by LC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm*, 2012, 43(6): 475-479.

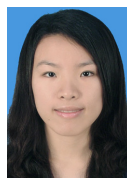
- [4] 金立, 沈林辉, 曹向英, 等. 液相色谱法测定牛奶中三聚氰胺残留量的不确定度[J]. 四川畜牧兽医, 2011, 11(253): 27-29.

Jin L, Shen LH, Cao XY, *et al.* HPLC method for the determination of melamine residues uncertainty in milk [J]. *Sichuan Anim Vet Sci*, 2011, 11(253): 27-29.

- [5] GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
GB/T 22388-2008 Determination of melamine in raw milk and dairy products [S].
- [6] JJF 1317-2001 液相色谱-质谱联用仪校准规范[S].
JJF 1317-2011 Calibration specification for liquid chromatography-mass spectrometers [S].

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



邹游, 学士, 助理工程师, 主要研究方向为食品兽药残留及非法添加物分析。
E-mail: yo.zou@qq.com