

液相色谱-串联质谱法检测中兽药中非法添加氟喹诺酮类药物含量的不确定度评估

李强*, 韵小娟, 王娇, 李庆霞, 符雨

(海南省动物疫病预防控制中心, 海口 571100)

摘要: **目的** 评估液相色谱-串联质谱法检测中兽药中非法添加氟喹诺酮类药物含量的不确定度。**方法** 建立液相色谱-串联质谱法检测中兽药(肥猪散、健胃散、银翘散)中非法添加氟喹诺酮类药物的含量测定方法, 根据JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》的相关规定, 对该方法的不确定度进行评定。**结果** 中兽药中氟喹诺酮类药物含量分别为 $C(\text{Enro})=100.90 \text{ mg/kg}$ 、 $C(\text{Cip})=100.34 \text{ mg/kg}$ 、 $C(\text{Norf})=100.21 \text{ mg/kg}$ 、 $C(\text{Oflo})=100.61 \text{ mg/kg}$ 时, 95%置信水平下, 取 $k=2$, 不确定度评估结果分别表示为 $X(\text{Enro})=(100.90\pm 6.957) \text{ mg/kg}$ 、 $X(\text{Cip})=(100.34\pm 7.067) \text{ mg/kg}$ 、 $X(\text{Norf})=(100.21\pm 6.898) \text{ mg/kg}$ 、 $X(\text{Oflo})=(100.61\pm 6.957) \text{ mg/kg}$ 。**结论** 评定结果表明, 影响检测结果的主要因素为液相色谱-串联质谱仪的灵敏度、天平的精密度、操作的规范性。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 中兽药; 氟喹诺酮类; 不确定度; 评估

Uncertainty evaluation of fluoroquinolones illegally added in veterinary herbal medicine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Qiang*, YUN Xiao-Juan, WANG Jiao, LI Qing-Xia, FU Yu

(Hainan Animal Disease Prevention and Control Center, Haikou 571100, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of fluoroquinolones illegally added in veterinary medicine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** A method for the determination of fluoroquinolones illegally added in veterinary herbal medicine (feizhu powder, Jianwei powder, Yinqiao powder) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established. According to the relevant provisions of JJF1059.1-2012 *Measurement uncertainty evaluation and representation*, the uncertainty of the method was evaluated. **Results** The content of fluoroquinolones in veterinary medicine was $C(\text{Enro})=100.90 \text{ mg/kg}$, $C(\text{Cip})=100.34 \text{ mg/kg}$, $C(\text{Norf})=100.21 \text{ mg/kg}$, $C(\text{Oflo})=100.61 \text{ mg/kg}$, respectively, when 95% confidence level, $k=2$, and the evaluation results were $X(\text{Enro})=(100.90\pm 6.957) \text{ mg/kg}$, $X(\text{Cip})=(100.34\pm 7.067) \text{ mg/kg}$, $X(\text{Norf})=(100.21\pm 6.898) \text{ mg/kg}$, $X(\text{Oflo})=(100.61\pm 6.957) \text{ mg/kg}$, respectively. **Conclusion** The main sources of uncertainty are the sensitivity of the liquid chromatography-tandem mass spectrometer, the precision of the balance, and the standard of operation.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; veterinary herbal medicine; fluoroquinolones; uncertainty; evaluation

基金项目: 2019年海南省自然科学基金青年基金项目(819QN393)

Fund: Supported by Youth Fund Project of Hainan Natural Science Foundation in 2019(819QN393)

*通讯作者: 李强, 畜牧师, 主要研究方向为饲料、兽药、畜禽产品质量安全监督检验与安全评价。E-mail: 86274987@qq.com

*Corresponding author: LI Qiang, Animal Priest, Hainan Animal Disease Prevention and Control Center, No.16, Xingdanlu Road, Haikou 571100, China. E-mail: 86274987@qq.com

1 引言

氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQs)是一类化学合成的抗菌药物。由于它具有抗菌谱广、抗菌活性强、毒副作用小、组织穿透力强、结构简单、给药方便等优点而被广泛用于国内外医学和兽医学临床,在畜牧养殖上,主要是促进畜禽生长和减少畜禽疾病,但由于其不合理使用和其滥用导致的药物残留、日增的细菌耐药性^[1-4]等危害,给人类健康带来潜在的安全威胁^[5]。根据农业部第 2292 号公告中停止生产、使用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 种原料药的各种盐、酯及其制剂,撤销相关兽药产品批准文号^[6]。近年来关于氟喹诺酮类药物残留的研究主要在农产品、水产品、畜产品上^[7-9],而中药中非法添加氟喹诺酮类药物的研究报道很少。农业部公告第 2448 号附件 2 第 5 条中列出了中药散剂中非法添加氟喹诺酮类药物(物质)的检查方法^[10],该检查方法中,采用高效液相色谱法,很容易出现假阳性,检测结果直接关系到中兽药散剂是否合格的判定。为了更准确定性和定量,得到更精确的检测值,本文选用了液相色谱-串联质谱法^[11,12]。

本文建立了液相色谱-串联质谱法检测中兽药(肥猪散、健胃散、银翘散)中非法添加氟喹诺酮类药物的含量测定方法,并且依据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[13]、CNAS-GL06《化学分析中不确定度的评估指南》^[14]的相关规定,对该方法的不确定度进行评定,探讨该方法运用过程中应注意的问题,通过对影响该项检测过程中不确定度的各项因素的分析计算,为准确检测结果提供可靠的参考依据。

2 材料与方法

2.1 实验原材料与试剂

标准品:恩诺沙星(enrofloxacin, Enro, 99.9%)、盐酸环丙沙星(ciprofloxacin, Cip, 99.8%)(中国兽药药品监察所);氧氟沙星(ofloxacin, Oflo, 99.0%)、诺氟沙星(norfloxacin, Norf, 99.0%)(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司);乙腈、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司),实验室用水为屈臣氏纯净水。肥猪散、健胃散、银翘散来自监督抽查。

2.2 实验仪器

Agilent 1260 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);4000Q-TRAP 三重四极杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);MS205DU 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);BSA2202S-CW 百分之一电子天平(德国赛多利斯公司);100 μ L 移液枪、1000 μ L 移液枪、5 mL 移液枪、10 mL 移液枪(德国 Eppendorf 公司);SB-3200D 超声机(宁波新芝生物科技股份有限公司);容量瓶 10 mL(\pm 0.02 mL)、容量瓶

100 mL(德国 Brand USP);Xbridge C₁₈ (150 mm \times 2.1 mm, 5 μ m)色谱柱(美国 Waters 公司);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司);Multifuge X1R 型台式离心机(美国 Thermo Scientific 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 4 种喹诺酮类标准储备液(1 mg/mL)

分别准确称量氟喹诺酮类标准品 10.00 mg 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解配成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.2 混合标准中间液(10 μ g/mL)

分别准确量取每种氟喹诺酮类标准储备液 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释配成浓度为 10 μ g/mL 的混合标准中间液。4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.3 标准曲线的绘制

分别准确量取氟喹诺酮类混合标准中间液 0.10、0.50、1.00、2.5、5 mL,用 0.1%甲酸水-乙腈(90:10, V:V)溶液定容至 100 mL,摇匀,分别得到浓度为 10、50、100、250、500 ng/mL 的标准工作液。4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.4 样品前处理

准确称取供试样 1 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚乙烯离心管中,加甲酸-乙腈 20.0 mL,超声处理 15 min,10000 r/min 离心 5 min。精密量取上清液 0.1 mL,用 0.1%甲酸水-乙腈(90:10)定容至 10.0 mL,摇匀,作为供试样溶液。供试样溶液和标准工作液均过 0.22 μ m 微孔滤膜,供液相色谱-质谱测定。

2.3.5 色谱条件

色谱柱:Waters Xbridge Columns C₁₈(2.1 mm \times 150 mm, 5.0 μ m);流动相:A相:乙腈;B相:0.1%甲酸水溶液;柱温:25 $^{\circ}$ C;流速:300 μ L/min;进样量:20 μ L;梯度洗脱:0.00~1.00 min, 10%A;1.00~5.00 min, 10%A 线性变化至 70%A;5.00~7.00 min, 70%A 线性变化至 100%A;7.00~9.00 min, 维持 100%A;9.00~9.10 min, 100%A 线性变化至 10%A;9.10~13.00 min, 维持 10%A。

2.3.6 质谱条件

电喷雾离子源;正离子扫描(electrospray ionization, ESI⁺);多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);喷雾电压 IS: 5500 V;离子源温度:550 $^{\circ}$ C;氟喹诺酮类药物的定性、定量离子对及锥孔电压等质谱参数见表 1。

2.3.7 氟喹诺酮类药物的含量计算数学模型

$$X(\mu\text{g/g})=V_1 \times V_2 \times C_x / V_3 / m_1$$

式中: X 为每克供试品中含有的氟喹诺酮类药物的质量, μ g/g; C_x 为从标准曲线上得到的氟喹诺酮类药物的含量, ng/mL; V_1 为超声处理使用的甲酸-乙腈的体积, mL; V_2 为量取过滤液的体积, mL; V_3 为过滤液定容体积, mL; m_1 为供试样质量, g。

表 1 质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters

目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/ms	碰撞能量/eV	去簇电压/V
恩诺沙星	360.4	316.3*	40	28.00	91.00
		342.2	40	28.00	80.00
环丙沙星	332.3	314.3*	40	27.33	75.78
		288.3	40	25.36	86.22
诺氟沙星	320.3	302.1*	40	28.67	75.00
		276.3	40	25.63	86.63
氧氟沙星	362.3	318.4*	40	26.31	84.40
		261.3	40	38.57	89.70

注: *: 定量离子。

3 结果与分析

3.1 不确定度来源分析

根据实验测定过程,对试样中氟喹诺酮类药物的残留量测定结果有影响的各种不确定的分量来源进行分析,引入的不确定度来源主要有:供试样制备引起的不确定度;标准溶液的配制、稀释引入的不确定度;标准曲线溶液的配制引入的不确定度;最小二乘法拟合标准曲线校准引入的不确定度;仪器测定引入的不确定度。

3.2 不确定度分量的计算

实验测定过程中使用了电子天平和一系列玻璃量具,按照 JJG196-2006《中华人民共和国国际计量检定规程》^[15,16]的要求,均有相应的最大允差。天平称量被测物质,按矩形分布考虑, $k=\sqrt{3}$,其标准不确定度为 $u(x)=\frac{\alpha}{\sqrt{3}}$ 。单刻度容量瓶及移液器的体积服从三角分布, $k=\sqrt{6}$,其标准不确定度为 $u(x)=\frac{\alpha}{\sqrt{6}}$ 。

3.2.1 供试样制备引起的不确定度 $u_r(\text{样})$

表 2 分量互不相关,合成供试样制备引起的不确定度

表 2 供试样制备引起的不确定度来源
Table 2 Uncertainty of sample preparation

不确定度来源	仪器	规格	容量允差(\pm)	影响因素	服从分布	k 值	不确定度 u	相对不确定度 u_r
供试样质量	天平	百分之一	0.05 g	重复性	矩形分布	$\sqrt{3}$	0.04082	0.04082
超声处理使用的乙腈的体积	移液器	10 mL	0.020 mL	体积校正 温度效应 重复性	三角分布	$\sqrt{6}$	0.05711	0.00286
过滤液的体积	移液器	100 μ L	2.0 μ L	体积校正(忽略温度效应)	三角分布	$\sqrt{6}$	0.816	0.00186
定容体积	容量瓶	10 mL	0.020 mL	体积校正 温度效应	三角分布	$\sqrt{6}$	0.01013	0.00101

$$u_r(\text{样})=\sqrt{u(m_1)^2+u(V_1)^2+u(V_2)^2+u(V_3)^2}=0.04174.$$

3.2.2 配制标准储备液引入的不确定度 $u_r(C_{1\text{ mg/mL}})$

配制标准储备液引入的不确定度主要来源有:标准物质的纯度引入的不确定度 $u_r(C\%)$;称量标准物质引入的不确定度 $u_r(m_2)$;10 mL 容量瓶校准和温度效应带来的相对不确定度 $u_r(V_{10\text{ mL}})$,详见表 3。

3.2.3 配制混合标准中间液的不确定度 $u_r(C_{10\text{ } \mu\text{g/mL}})$

混合标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)的配制主要由 100 μL 移液器、10 mL 容量瓶校准和容量瓶温度效应引起。100 μL 移液器最大允差为 $\pm 2.0\text{ } \mu\text{L}$,按三角形分布, $k=\sqrt{6}$,则 100 μL 移液器产生的相对不确定度为: $u_r(V_{100\text{ } \mu\text{L}})=\frac{2.0}{100 \times \sqrt{6}}=0.00816$ 。由表 3 可知 10 mL 容量瓶相对不确定度为 $u_r(V_{10\text{ mL}})=0.00404$ 。上述分量合成配制标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)的相对不确定度: $u_r(C_{10\text{ } \mu\text{g/mL}})=\sqrt{4[u_r(V_{100\text{ } \mu\text{L}})]^2+[u_r(V_{10\text{ mL}})]^2}=0.01681$ 。

3.2.4 配制标准工作液引入的不确定度 $u_r(C_s)$

标准工作液是由混合标准中间液逐级稀释配制得到的一系列质量浓度。标准曲线各点在配制过程中引入的不确定度分量及相对数值见表 4。

表 3 配制标准储备液引入的不确定度来源
Table 3 Uncertainty of standard reserve liquid

不确定度来源		恩诺沙星(enro)	环丙沙星(cip)	诺氟沙星(norf)	氧氟沙星(oflo)	
$u_r(C\%)$	纯度/%	99.9	99.8	99.9	99.9	
	不确定度/%	0.1	0.2	0.1	0.1	
	服从分布	均匀分布	均匀分布	均匀分布	均匀分布	
	k 值	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	
	不确定度 u /%	0.05775	0.1155	0.05775	0.05775	
	相对不确定度 u_r	0.00058	0.00116	0.00058	0.00058	
$u_r(m_2)$	天平	十万分之一	十万分之一	十万分之一	十万分之一	
	最大允差/mg	0.04	0.04	0.04	0.04	
	服从分布	矩形分布	矩形分布	矩形分布	矩形分布	
	k 值	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	
	称样量/	10.00	10.00	10.00	10.00	
	不确定度 u	0.03266	0.03266	0.03266	0.03266	
	相对不确定度 u_r	0.00327	0.00327	0.00327	0.00327	
	容量瓶/mL	10	10	10	10	
	体积校正引入的不确定度 $u(V_{\text{定容}})$	最大允差/ 服从分布	± 0.02 三角分布	± 0.02 三角分布	± 0.02 三角分布	± 0.02 三角分布
	k 值	$\sqrt{6}$	$\sqrt{6}$	$\sqrt{6}$	$\sqrt{6}$	
$u_r(V_{10\text{mL}})$	$u(V_{\text{定容}})$	0.00816	0.00816	0.00816	0.00816	
	实验温度/ $^{\circ}\text{C}$	20 \pm 5	20 \pm 5	20 \pm 5	20 \pm 5	
	温度效应引入的不确定度 $u(t_{10\text{mL}})$	溶剂(乙腈)体积膨胀系数/(mL/ $^{\circ}\text{C}$) 服从分布	1.37×10^{-3} 均匀分布	1.37×10^{-3} 均匀分布	1.37×10^{-3} 均匀分布	1.37×10^{-3} 均匀分布
	k 值	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	
	$u(t_{10\text{mL}})$	0.03955	0.03955	0.03955	0.03955	
	$u(V_{10\text{mL}})$	0.04038	0.04038	0.04038	0.04038	
	$u_r(V_{10\text{mL}})$	0.00404	0.00404	0.00404	0.00404	
	合成配制标准储备液的相对不确定度: $u_r(C_{1\text{mg/mL}}) = \sqrt{[u_r(C\%)]^2 + [u_r(m_2)]^2 + [u_r(V_{10\text{mL}})]^2}$		0.00523	0.00533	0.00523	0.00523

表 4 标准曲线各点在配制过程中引入的不确定度
Table 4 Uncertainty of each point of standard curve in the process of preparation

标曲浓度/(ng/mL)	移液枪				100 mL 容量瓶				合成标准曲线各点的相对不确定度 $u_r(C_s)$	
	规格/ μL	移取体积/ μL	容量允差(\pm)	相对不确定度 $u_r(V)$	体积校正		温度效应(20 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$)			
					容量允差(\pm)	不确定度 $u(V_{100\text{mL}})$	mL/ $^{\circ}\text{C}$ (溶剂按水计算)	不确定度 $u(t_{100\text{mL}})$		
10	100	100	2.0	0.00816	0.05	0.02041	2.08 $\times 10^{-4}$	0.00600	0.00021	0.00816
20	1000	500	1.0	0.00082	0.05	0.02041	2.08 $\times 10^{-4}$	0.00600	0.00021	0.00085
100	1000	1000	1.0	0.00041	0.05	0.02041	2.08 $\times 10^{-4}$	0.00600	0.00021	0.00046
250	5000	2500	50	0.00816	0.05	0.02041	2.08 $\times 10^{-4}$	0.00600	0.00021	0.00816
500	5000	5000	50	0.00408	0.05	0.02041	2.08 $\times 10^{-4}$	0.00600	0.00021	0.00409

则由标准曲线配制引入的相对不确定度： $u_r(C_s)=$

$$\sqrt{0.00816^2 + 0.00085^2 + 0.00046^2 + 0.00816^2 + 0.00409^2} = 0.01228。$$

3.2.5 最小二乘法拟合标准曲线校准引入的不确定度 $u_r(\text{Curve})$

每个浓度的标准工作液进样3次,以特征离子质量色谱峰面积 A 为纵坐标,标准工作液浓度 $C(\text{ng/mL})$ 为横坐标,绘制标准曲线,得到拟合回归方程为 $A_i = aC_i + b$ 和拟合系数 r^2 , 其中, a 为斜率, b 为截距。相关测定数据见表5。

表5 标准曲线线性关系
Table 5 Linear relation of standard curve

待测物	回归方程	相关系数 r^2
恩诺沙星	$A=1530.4C+5166.4$	0.9999
环丙沙星	$A=6729.6C+11984$	0.9998
诺氟沙星	$A=7923C+24677$	0.9999
氧氟沙星	$A=8583.5C+25781$	0.9998

则标准曲线拟合产生的不确定度为:

$$u(\text{Curve}) = \frac{S_R}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(C_x - \bar{C}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C}_i)^2}}, \text{ 其中:}$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (aC_i + b)]^2}{mn - 2}}, S_R \text{ 为标准溶液峰面积残差}$$

的标准差, $S_R(\text{Enro})=1657$, $S_R(\text{Cip})=16028$, $S_R(\text{Norf})=7271$, $S_R(\text{Oflo})=11759$; m 为标准溶液个数, $m=5$; n 为标准溶液测定次数, $n=3$; p 为待测物测定次数, $p=3$; \bar{C}_i 为标准溶液的平均浓度; a 为斜率, b 为截距。

被测样品3次平行测定后,分别从标准曲线上得到的氟喹诺酮类药物的含量 $C_x(\text{ng/mL})$ 见表6。

表6 被测样品测定数据
Table 6 Determination results of samples

待测化合物	峰面积 A_x	待测物浓度 $C_x(\text{ng/mL})$	平均浓度/(ng/mL)
恩诺沙星	160456	100.82	100.90
	160585	100.90	
	160698	100.97	
	695042	101.50	
环丙沙星	685148	100.03	100.34
	681472	99.48	
	819505	100.32	
诺氟沙星	815000	99.75	100.21
	821401	100.56	
	882575	99.82	
氧氟沙星	895874	101.37	100.61
	889547	100.63	

被测样品由标准曲线拟合产生的标准不确定度为:

$$u(\text{Curve}_{\text{Enro}})=0.71909, u(\text{Curve}_{\text{Cip}})=1.60930, u(\text{Curve}_{\text{Norf}})=0.60022, u(\text{Curve}_{\text{Oflo}})=0.88624, \text{ 相对标准不确定度为:}$$

$$u_r(\text{Curve}_{\text{Enro}})=0.00719, u_r(\text{Curve}_{\text{Cip}})=0.01609, u_r(\text{Curve}_{\text{Norf}})=0.00600, u_r(\text{Curve}_{\text{Oflo}})=0.00886。$$

3.2.6 液相色谱-质谱联用仪引入的不确定度 $u_r(\text{仪器})$

根据海南省质量技术监督局出具的仪器校准证书作为评价依据,液相色谱-质谱联用仪引入的扩展不确定度 $u_r(\text{仪器})=5%$ 。

3.3 标准不确定性的合成与扩展

3.3.1 各分量相对标准不确定度汇总

试样中氟喹诺酮类药物的残留量测定结果有影响的各不确定分量来源汇总见表7。

表7 各分量不确定度汇总表
Table 7 Summary of each uncertainty component

来源	相对标准不确定度 U_r
供试样制备引起的不确定度 $u_r(\text{样})$	0.04174
配制标准储备液引入的不确定度 $u_r(C_1 \text{ mg/mL})$	$u_r(C_1 \text{ mg/mL})_{\text{Enro}}=0.00523$ $u_r(C_1 \text{ mg/mL})_{\text{Cip}}=0.00533$ $u_r(C_1 \text{ mg/mL})_{\text{Norf}}=0.00523$ $u_r(C_1 \text{ mg/mL})_{\text{Oflo}}=0.00523$
配制标准中间液的不确定度 $u_r(C_{10} \mu\text{g/mL})$	0.01681
配制标准曲线时各点引入的不确定度 $u_r(C_s)$	0.01228
最小二乘法拟合标准曲线校准引入的不确定度 $u_r(\text{Curve})$	$u_r(\text{Curve}_{\text{Enro}})=0.00719$ $u_r(\text{Curve}_{\text{Cip}})=0.01609$ $u_r(\text{Curve}_{\text{Norf}})=0.00600$ $u_r(\text{Curve}_{\text{Oflo}})=0.00886$
液相色谱-串联质谱仪引入的不确定度 $u_r(\text{仪器})$	5%

3.3.2 合成标准不确定度

由上述各因素的不确定度互不相关,合成液相色谱-串联质谱法检测中兽药中氟喹诺酮类药物含量的相对不

$$\text{确定度为: } u_r(X) = \sqrt{[u_r(\text{仪器})]^2 + [u_r(\text{样})]^2 + [u_r(\text{Curve})]^2 + [u_r(C_s)]^2 + [u_r(C_{10} \mu\text{g/mL})]^2 + [u_r(C_1 \mu\text{g/mL})]^2}$$

$$\text{则 } u_r(X_{\text{Enro}})=0.06895=6.895\%, u_r(X_{\text{Cip}})=0.07043=7.043\%, u_r(X_{\text{Norf}})=0.06884=6.884\%, u_r(X_{\text{Oflo}})=0.06915=6.915\%。$$

3.3.3 相对扩展不确定度

95%置信水平下,取 $k=2$,则中兽药中氟喹诺酮类药物含量的相对扩展不确定度分别为 $U(\text{Enro})=100.90 \times 6.895\%=6.957$, $U(\text{Cip})=100.34 \times 7.043\%=7.067$, $U(\text{Norf})=100.21 \times 6.884\%=6.898$, $U(\text{Oflo})=100.61 \times 6.915\%=6.957$ 。

3.3.4 测定结果

按照该方法测定中兽药中氟喹诺酮类药物含量 (mg/kg) 的结果为: $X(\text{Enro})=100.90\pm 6.957$, $k=2$; $X(\text{Cip})=100.34\pm 7.067$, $k=2$, $X(\text{Norf})=100.21\pm 6.898$, $k=2$, $X(\text{Oflo})=100.61\pm 6.957$, $k=2$ 。

4 结 论

通过不确定度分析, 采用液相色谱-串联质谱法检测中兽药中氟喹诺酮类药物含量的不确定度主要来源贡献大小依次是 $u_r(\text{仪器})$ 、 $u_r(\text{样})$ 、 $u_r(C_{10 \mu\text{g/mL}})$ 、 $u_r(C_s)$ 、 $u_r(\text{Curve})$ 、 $u_r(C_1 \mu\text{g/mL})$ 。 $u_r(\text{仪器})$ 分量引起的不确定度最大。因此, 在实际工作中优先选择使用高灵敏度的检测仪器。同时采用高精密度天平精密称量和选择高精密度的移液器和容量瓶, 注意实验过程中的规范操作, 也会大大减少不确定度对结果准确度的影响, 从而提高检测结果的准确度和可靠性。

参考文献

- [1] Wang HW, Liu YQ, Wei SL, *et al.* Selective extraction and determination of fluoroquinolones in bovine milk samples with montmorillonite magnetic molecularly imprinted polymers and capillary electrophoresis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(2): 589–598.
- [2] 张冬冬, 苏超, 洪伟, 等. 动物源食品中氟喹诺酮类兽药残留检测的研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2016, 22(13): 38–41.
Zhang DD, Su C, Hong W, *et al.* Advances in the detection of fluoroquinolones residues in animal-derived foods [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2016, 22(13): 38–41.
- [3] Seidel J, Clarke T, Mathew B. To cipro or not to cipro bilateral achilles ruptures with the use of quinolones [J]. *J Am Podiat Med Associat*, 2015, 105(2): 185–188.
- [4] 李华强, 李素琴, 丁真真. 氟喹诺酮类抗菌药物的交叉耐药性分析[J]. *公共卫生与临床医学*, 2009, (4): 271–274.
Li HQ, Li SQ, Ding ZZ. Cross-resistance analysis of fluoroquinolones [J]. *Publ Health Clin Med*, 2009, (4): 271–274.
- [5] Niwa H, Chuma T, Okamoto K, *et al.* Simultaneous detection of mutations associated with resistance to macrolides and quinolones in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using a PCR-line probe assay [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22(4): 374–379.
- [6] 中华人民共和国农业部. 农业部第 2292 号公告[EB/OL]. [2015-9-7]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm.
Ministry of Agriculture of the Peoples Republic of China. Ministry of Agriculture Announcement No 2292 [EB/OL]. [2015-9-7]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm.
- [7] 范维, 高晓月, 陈超, 等. 动物源性食品中喹诺酮类药物残留的检测[J]. *肉类研究*, 2017, 31(4): 36–42.
Fan W, Gao XY, Chen C, *et al.* Screening and confirmation of quinolones residues in animal-derived food [J]. *Meat Res*, 2017, 31(4): 36–42.
- [8] 倪海平, 朱宝立, 朱鸿儒. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 15 种药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 8(9): 3549–3555.

Ni HP, Zhu BL, Zhu HR. Simultaneous determination of 15 drugs residues in eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 8(9): 3549–3555.

- [9] 肖英平, 李玲, 曾庆坤, 等. 高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法检测荷斯坦和水牛原料乳中喹诺酮残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(9): 3726–3731.
Xiao YP, Li L, Zeng QK, *et al.* Determination of quinolone residues in raw Holstein and Buffalo milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(9): 3726–3731.
- [10] 中华人民共和国农业部. 农业部第 2448 号公告. 附件 2: 第 5 条, 肥猪散、健胃散、银翘散等中药散剂中非法添加氟喹诺酮类药物(物质)检查方法[EB/OL]. [2016-09-22]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201609/t20160922_5282118.htm
Ministry of Agriculture of the Peoples Republic of China. Ministry of Agriculture Announcement No 2448. Annex 2: Article 5, Examination method of illegally adding fluoroquinolones in traditional Chinese medicine powder such as Feizhu san, Jianwei san and Yinqiao san [EB/OL]. [2016-09-22]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201609/t20160922_5282118.htm
- [11] 曹莹, 蒋音. 利用液质联用仪快速确证中兽药中的氟喹诺酮类药物[J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(6): 27–29.
Cao Y, Jiang Y. Rapid confirmation of fluoroquinolones in traditional Chinese medicine by LC-MS [J]. *Chin J Vet Drug*, 2012, 46(6): 27–29.
- [12] 韩合敬, 魏秀丽, 郝智志, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定中兽药散剂中 4 种喹诺酮药物[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, (1): 282–283, 285
Han H, Wei X, Hao ZH, *et al.* Determination of four quinolone drugs in veterinary traditional Chinese medicine powders by UPLC-MS [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017, (1): 282–283, 285.
- [13] JJF 1059. 1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [14] CNAS-GL 06 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 06 Guidance on evaluation the uncertainty in chemical analysis [S].
- [15] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [16] JJF 646-2006 移液器检定规程[S].
JJF 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



李 强, 畜牧师, 主要研究方向为饲料、兽药、畜禽产品质量安全监督检验与安全评价。

E-mail: 86274987@qq.com