

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 土霉素残留的不确定度评估

崔向云\*, 张雪峰, 袁凤琴, 李 照, 常建军, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱-串联质谱法对牛奶中土霉素残留的不确定度进行评估。**方法** 测定牛奶中的土霉素, 建立该方法测定牛奶中土霉素含量不确定度的数学模型, 确定不确定度来源并对其评定。**结果** 当牛奶中土霉素含量为 0.049  $\mu\text{g/g}$  时, 其扩展不确定度为 0.0036  $\mu\text{g/g}$  ( $k=2$ )。其中, 测量重复性和标准曲线对不确定度的影响最大。**结论** 采用超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中土霉素含量应严格控制实验条件, 保证实验具有良好的重复性, 另外还要保证标准曲线具有良好的线性。

**关键词:** 土霉素; 超高效液相色谱-串联质谱法; 牛奶; 不确定度

## Uncertainty evaluation of oxytetracycline in liquid milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CUI Xiang-Yun\*, ZHANG Xue-Feng, YUAN Feng-Qin, LI Zhao,  
CHANG Jian-Jun, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Hohhot 011500, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a mathematical model of uncertainty evaluation for the determination results of oxytetracycline in liquid milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Methods** The sources of uncertainty of the whole determination procedure were analyzed and the combined uncertainty was finally obtained. **Results** The expanded uncertainty of 0.0036  $\mu\text{g/g}$  ( $k=2$ ) with 0.049  $\mu\text{g/g}$  of the content of oxytetracycline was derived. The major sources of uncertainty of measurement included the repeatability of detection and the curve fitting. **Conclusion** It is necessary to control experimental conditions and the linear of standard curve to make sure the testing results are accurate.

**KEY WORDS:** oxytetracycline; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; liquid milk; uncertainty

四环素类抗生素包括四环素、土霉素、金霉素以及强力霉素, 在奶牛养殖中常被添加到饲料中, 用于防治奶牛肠道感染以及促进生长。然而残留在牛体中的抗生素会进入到牛奶, 从而对人类产生不良的影

响<sup>[1,2]</sup>。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的土霉素残留<sup>[3]</sup>, 采用 JJF 1059-1999《测量不确定度评定与表示》<sup>[4,5]</sup>对其结果进行不确定度分析, 以期找出影响检测结果不确定度的各种因素, 为评

\*通讯作者: 崔向云, 硕士, 主要研究方向为乳品分析。E-mail: cuixiangyun@mengniu.cn

\*Corresponding author: CUI Xiang-Yun, Master, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co.Ltd., Hohhot 011500, China. E-mail: cuixiangyun@mengniu.cn

定检测结果准确度提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联四级杆质谱仪(Waters, 美国): 配有电喷雾离子源(ESI); 固相萃取装置。

土霉素标准品(Dr. Ehrenstorfer GmbH, 德国); 实验室用水为去离子水; LB 固相萃取柱(60 mg/3 mL); 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其他试剂均为优级纯。

### 1.2 检测方法

依据 GB/T 21317-2007《动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法》。

### 1.3 样品制备

称取牛奶样品 5 g 于 50 mL 比色管中, 精确至 0.0001 g, 加入 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液, 并定容至 50 mL, 涡旋、离心。准确量取上述上清液 10 mL 转移至已活化好的 HLB 固相萃取柱, 待样液完全通过固相萃取柱填料时加入 5 mL 体积比为 5% 的甲醇-水溶液淋洗并减压抽干, 再加入 5 mL 甲醇进行洗脱, 收集洗脱液并氮气吹干, 用 1 mL 流动相溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后用于超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)分析。

### 1.4 仪器条件

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 柱温为 40 °C; 进样体积为 10 μL; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-水; 梯度洗脱为: 0 min, 体积分数为 15% 的 A 溶液; 0~1.0 min, 体积分数为 15% 的 A 溶液; 1.0~2.0 min, 体积分数为 15%~25% 的 A 溶液; 2.0~2.5 min, 体积分数为 25%~30% 的 A 溶液; 2.5~3.0 min, 体积分数为 30% 的 A 溶液; 3.0~3.5 min, 体积分数为 30%~40% 的 A 溶液;

3.5~4.5 min, 体积分数为 40%~80% 的 A 溶液; 4.5~5.0 min, 体积分数为 80%~15% 的 A 溶液; 流速为 0.4 mL/min。

#### 1.4.2 质谱条件

离子化模式为电喷雾正离子模式(ESI<sup>+</sup>); 质谱扫描方式为多反应监测(MRM); 电离电压为 3 kV; 离子源温度为 120 °C; 去溶剂气温度为 350 °C; 去溶剂气(N<sub>2</sub>)流量为 500 L/h; 碰撞气(高纯 Ar)流量为 50 L/h。锥孔电压、碰撞能量及定性和定量离子等质谱参数如表 1 所示。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 数学模型

采用外标法定量, 按式(1)计算土霉素含量:

$$X = \frac{C_s \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} \quad (1)$$

公式(1)中: X: 样品中待测组分的含量, 单位为 μg/g; C<sub>s</sub>: 被测样品的浓度; V<sub>1</sub>: 提取液定容体积, 50 mL; V<sub>2</sub>: 用于 SPE 净化的提取液体积, 10 mL; V<sub>3</sub>: 最终上机的浓缩液定容体积, 1 mL; m: 最终样液所代表的样品质量, 单位为 g。

公式(1)是根据样品测定原理给出的, 并没有考虑各种随机因素对测量结果的影响。而在评定测量不确定度时必须考虑各种随机影响带入的不确定度分量。在测量模型中引入一个数值等于 1 的重复性系数  $f_{rep}$ 。该系数  $f_{rep}$  的相对标准不确定度  $u_r(f_{rep})$  就等于在重复性条件下重复测定某个量 X 所得到一组观测值的相对标准不确定度  $u_r(\bar{x})$ 。这样就合并评定了各种随机因素引入的不确定度分量。因此, 完整的评定不确定度的测量模型应写成下式:

$$X = \frac{C_s \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} f_{rep} \quad (2)$$

表 1 土霉素的质谱参数及保留时间

Table 1 Mass spectrum parameters and retention time of oxytetracycline

化合物	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
土霉素	1.92	461.2	426.1*	0.1	22	22
			443.2			13

\*为定量离子

## 2.2 不确定度来源分析

从测定过程和建立的数学模型, 测定土霉素的不确定度来源有: 测定重复性带来的不确定度; 被测样品的浓度  $u_r(C_s)$ , 包含三个分量, 即校准曲线本身的不确定性引入的不确定度  $u_r(C_s)_1$ 、标准溶液浓度本身的不确定度  $u_r(C_s)_2$  和使用标准溶液所处的温度条件引入的不确定度  $u_r(C_s)_3$ ; 提取液定容体积  $u_r(V_1)$ ; 用于 SPE 净化的提取液体积  $u_r(V_2)$ ; 最终上机的浓缩液定容体积  $u_r(V_3)$ ; 最终样液所代表的样品质量  $u_r(m)$  等几个方面。

## 2.3 绘制校准曲线并测定

配制了 5 个不同浓度的土霉素标准溶液, 每个浓度重复进样 2 次并记录色谱峰面积, 详见表 2。

用最小二乘法进行线性拟合, 得到标准曲线方程为:  $y=92123C-351.84$ , 相关系数  $r^2=0.9959$ 。本次测定牛奶中土霉素残留量时, 平行测定两次得到的色谱峰面积分别为  $y_1=4077$ ,  $y_2=4251$ 。利用标准曲线方程得到土霉素含量分别为  $0.048 \mu\text{g/mL}$  和  $0.050 \mu\text{g/mL}$ , 平均值为  $C_s=0.049 \mu\text{g/mL}$ 。得到牛奶中土霉素残留量:

$$X = \frac{C_s \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} = \frac{0.049 \times 50 \times 1}{5 \times 10} = 0.049 \mu\text{g/g}$$

## 2.4 各分量标准不确定度的评估

### 2.4.1 测量重复性的相对标准不确定度

为获得可靠性较高的标准偏差, 平行测定了 8 份牛奶中土霉素含量  $X$ , 所得结果见表 3。

利用上述数据按照贝塞尔公式计算的单次测量

的标准偏差  $s(x)=0.0020 \mu\text{g/g}$ 。单次测量的重复性相

$$\text{对标准偏差: } S_r(x) = \frac{s(x)}{x} = \frac{0.0020}{0.0491} = 0.041。$$

由于该偏差具有较大的自由度, 可靠性比较高, 本实验中利用之前测定得到的单次测量的预评估的重复性相对标准偏差, 计算本次测量平均值的重复性相对标准偏差。检测了两份牛奶样品, 两次检测结果平均值的重复性相对标准偏差为:

$$u_r(\bar{x}) = u_r(f_{rep}) = \frac{S_r(x)}{\sqrt{2}} = \frac{0.041}{\sqrt{2}} = 0.029$$

该分量已合并研究了各种随机因素, 如液质联用仪的变动性、体积的读数偏差、样品的不均匀以及用 HLB 固相萃取柱净化对回收率的影响等。在随后的不确定度分量评定时就无需考虑各种随机因素了。

### 2.4.2 被测样品浓度的标准不确定度

被测样品浓度的不确定度包含 3 个分量: 校准曲线本身的不确定性引入的不确定度  $u_r(C_s)_1$ 、标准溶液浓度本身的不确定度  $u_r(C_s)_2$  和使用标准溶液所处的温度条件引入的不确定度  $u_r(C_s)_3$ 。

#### 2.4.2.1 由校准曲线引入的不确定度分量

由于拟合直线本身具有不确定性, 用拟合直线计算测定液的浓度引入的标准不确定度按下式计算:

$$s(C_s)_1 = \frac{s(y)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_s - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}} \quad (3)$$

式中残余标准偏差

$$S(y) = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (a + bx_i)]^2}{n - 2}} = 113.27$$

表 2 不同浓度下的土霉素标准溶液对应的色谱峰面积

Table 2 The chromatographic peak area under different concentration of oxytetracycline standard solution

浓度 $C_i/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.01	0.02	0.05	0.10	0.20
面积值 1	912	1570	4185	8165	18194
面积值 2	867	1642	4259	8021	18680

表 3 牛奶中加标土霉素测得的含量

Table 3 The content of oxytetracycline in milk

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
结果/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	0.048	0.051	0.049	0.051	0.050	0.046	0.051	0.047
平均含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	0.0491							

公式(3)中:  $a$ : 校准曲线截距;  $b$ : 一校准曲线斜率;  $p$ : 测量样品  $x$  的次数;  $n$ —校准测量的次数;  $C_S$ : 测得样品的土霉素的浓度;  $\bar{C}$ : 不同校准标准的平均值;  $i$ : 一代表校准标准序号的附标。

本测量中,  $n=5$ ,  $p=2$ , 测定液浓度平均值  $C_S=0.049 \mu\text{g/mL}$ 。把数据代入公式(3)得到由标准曲线引入的标准不确定度  $s(C_S)_1=0.0011 \mu\text{g/mL}$ , 其相对标准不确定度为:  $u_r(C_S)_1 = s_r(C_S)_1 = \frac{0.0011}{0.049} = 0.022$ 。

#### 2.4.2.2 标准溶液浓度的标准不确定度

土霉素标准溶液在配制过程中其不确定度来源包括: ① 标准品纯度; ② 称量用天平校准的允许差; ③ 体积, 主要包括容量瓶校准的允许差、容量瓶称量液体的重复性和所使用液体受温度的影响。

经计算, 配制 100 mL 浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的土霉素标准溶液的相对标准不确定度为  $u_r(C_S)_2=0.00046$ 。

#### 2.4.2.3 使用标准溶液因温度变动引起标准溶液浓度的标准不确定度

给出的土霉素标准溶液的浓度是在 20  $^{\circ}\text{C}$  时的浓度, 实验室温度变化介于  $\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  之间, 不进行温度修正。甲醇的体积膨胀系数为  $1.1 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ , 假设为均匀分布, 则由温度变化引入的土霉素标准溶液浓度的相对标准不确定度为:

$$u_r(C_S)_3 = \frac{5 \times 1.1 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.0032$$

所以, 测定液浓度的合成相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(C_S) = \sqrt{u_r^2(C_S)_1 + u_r^2(C_S)_2 + u_r^2(C_S)_3} = \sqrt{0.022^2 + 0.00046^2 + 0.0032^2} = 0.022$$

#### 2.4.3 试样质量的标准不确定度

天平校准证书说明校准的允许差为  $\pm 0.0002 \text{ g}$ , 假定为均匀分布, 标准不确定度:

$$u_r(m) = \frac{0.0002}{\sqrt{3}} = 0.00012$$

称样量为 5 g, 相对标准不确定度:

$$u_{rel}(m) = \frac{0.00012}{5} = 0.000024$$

#### 2.4.4 提取液定容体积( $V_1$ )测量的标准不确定度

提取液在 50 mL ( $V_1$ ) A 级比色管中定容, 由于检定规程 JJG196-2006<sup>[6]</sup>未对 50 mL A 级比色管做说明<sup>[6]</sup>, 故以 50 mL A 级容量瓶来近似估算。50 mL A 级容量瓶的允许误差为  $\pm 0.05 \text{ mL}$ 。假定为三角形分布, 其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_1) = \frac{0.05}{50\sqrt{6}} = 0.00041$$

#### 2.4.5 用于 HLB 固相萃取柱净化溶液体积( $V_2$ )的标准不确定度

用 10 mL A 级单线吸管吸取净化液, 根据检定规程 JJG196-2006<sup>[6]</sup>说明, 10 mL A 级吸管的允许误差为  $\pm 0.02 \text{ mL}$ , 假定为三角形分布, 10 mL 的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_2) = \frac{0.020}{10\sqrt{6}} = 0.0082$$

#### 2.4.6 测定液定容体积( $V_3$ )的标准不确定度

用 1 mL 刻度试管定容最终测定液, 根据检定规程 JJG196-2006<sup>[6]</sup>说明, 1 mL A 级吸管的允许误差为  $\pm 0.007 \text{ mL}$ , 假定为三角形分布, 1 mL 的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_3) = \frac{0.007}{1 \times \sqrt{6}} = 0.0029$$

### 2.5 合成标准不确定度

各分量的相对标准不确定度的汇总情况见表 4

表 4 输入量及其相对标准不确定度

Table 4 Input and relative standard uncertainty

输入量	输入量说明	输入量数值 $x$	相对标准不确定度 $u_r$
$f_{rep}$	重复性	1.0	0.029
$C_S$	测定液浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	0.049	0.022
$m$	样品质量/g	5	0.000024
$V_1$	提取液定容体积/mL	50	0.00041
$V_2$	净化液体积/mL	10	0.0082
$V_3$	测定液定容体积/mL	1	0.0029

按照评定不确定度的公式(2)计算土霉素残留量  $X$  的合成标准不确定度。

$$u_c(x) = x \sqrt{u_r^2(f_{rep}) + u_r^2(C_s) + u_r^2(m)u_r^2(V_1)u_r^2(V_2)u_r^2(V_3)} \\ = 0.0018$$

## 2.6 扩展不确定度

取包含因子  $k=2$ , 扩展不确定度为:  $U(x)=k u_c(x)=2 \times 0.0018=0.0036 \mu\text{g/g}$ 。

## 3 报告不确定度

用超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中土霉素残留量, 测量 2 个样品, 取其平均值报告结果, 平均值的扩展不确定度为  $U(x)=0.0036 \mu\text{g/g}(k=2)$ 。

## 4 结论

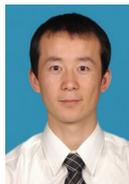
通过对超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中土霉素含量的不确定来源进行分析, 并评定各不确定度分量, 得出该分析方法的扩展不确定度为  $0.0036 \mu\text{g/g}$ , 包含因子  $k=2$ ; 同时可以看出, 采用超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中土霉素含量的不确定来源主要是测定重复性和测定液浓度, 其中测定液浓度中标准曲线影响最大, 可将不确定度来源影响最大的因素归结为测定重复性和标准曲线。所以采用超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中土霉素含量应严格控制实验条件, 保证实验具有良好的重复性, 另外还要保证标准曲线具有良好的线性。

## 参考文献

- [1] 秦燕, 陈毓芳, 林峰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中的多种四环素残留 [J]. 食品科学, 2005, 26(3): 202-204.
- [2] 蔡志斌, 张英, 刘丽. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中 3 种四环素类抗生素残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 270-272.
- [3] GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法[S]. GB/T 21317-2007 Determination of tetracyclines residues in food of animal origin-LC-MS/MS method and HPLC method[S].
- [4] 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].
- [5] 王玉英, 胡利敏, 赵建飞, 等. 乳与乳制品中山梨酸检测方法不确定度的评估[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(12): 48-51. Wang YY, Hu LM, Zhao JF, et al. Uncertainty evaluation of sorbic acid detection in milk and dairy products [J]. China Dairy Ind, 2012, 40(12): 48-51.
- [6] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S]. JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].

(责任编辑: 赵静)

## 作者简介



崔向云, 硕士, 主要研究方向为乳品分析。  
E-mail: cuixiangyun@mengniu.cn