

肠衣中12种磺胺类药物残留量测定的 不确定度分析

王飞, 陈其勇*, 王永芳, 宓捷波, 李淑静, 许泓
(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 为保证实验室测试结果的准确性和可靠性, 采用液相色谱-串联质谱法对肠衣中12种磺胺类药物残留量测定的不确定度进行评估。**方法** 按照《测量不确定度评定与表示》的要求, 对GB/T 20759-2006《畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》进行肠衣中12种磺胺类药物测定的不确定度分析。**结果** 建立了相应的数学模型, 对测量结果的不确定度来源, 如标准物质、标准溶液配制、样品称量、样品定容、样品回收率及结果的重复性等进行了量化分析。**结论** 标准溶液的配制及稀释、样品回收率对样品的合成不确定度贡献较大。**关键词:** 不确定度; 磺胺; 液相色谱-串联质谱法; 肠衣

Uncertainty evaluation of twelve kinds of sulfanilamide residues in casing

WANG Fei, CHEN Qi-Yong*, WANG Yong-fang, MI Jie-Bo, LI Shu-Jing, XU Hong

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of twelve kinds of sulfanilamide residues in casing by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), so as to ensure the accuracy and reliability of results. **Methods** Evaluation and expression of uncertainty were measured based on <Evaluation and expression of uncertainty in measurement> during analyzing twelve kinds of sulfanilamide residues in casing according to GB/T 20759-2006. **Results** A mathematical model was established, all of the influence factors on measuring uncertainty were found out, and the uncertainties of type A or type B were evaluated respectively. **Conclusion** The preparation and elution of solutions, the recoveries and the fitted linear regression equation for the calibration curve were the main source of uncertainties.

KEY WORDS: uncertainty evaluation; sulfanilamide residues; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; casing

1 引言

磺胺类药物是一类用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物。因其在体内的作用时间和代谢

时间较长, 因此蓄积浓度超过一定值时将对人体机能有害。不确定度是表征被测量值的分散性与测量结果相关性的参数。一切测量结果都不可避免地具有不确定度。测量不确定度对于测量结果之间的比较、数

基金项目: 天津检验检疫局科技计划项目(TK076-2013)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of TJCIQ (TK076-2013)

*通讯作者: 陈其勇, 高级工程师, 主要研究方向为农兽药及食品添加剂多残留检测。E-mail: chenqy@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: CHEN Qi-Yong, Senior Engineer, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.158 Jingmen Road, Free Trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: chenqy@tjciq.gov.cn

据分析、检测过程中需要注意的因素、方法的确认等具有十分重要的意义^[1-3]。本研究按照 JJF 1059-1999《测量不确定度评定与表示》^[4]的要求,按照 GB/T 20759-2006^[5]方法对肠衣中 12 种磺胺类药物检测进行不确定度评价,以期找出影响检测结果不确定度的各种因素,为评定检测结果的可靠程度提供参考。

2 材料和方法

2.1 仪器及试剂

Agilent 1290-API 4000⁺液相色谱-串联质谱仪(美国 Agilent 公司); BP-211D 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 标准品: 磺胺甲基异恶唑、磺胺甲氧嘧啶、磺胺异恶唑、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯噻唑、磺胺苯吡唑、磺胺二甲嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲基异恶唑均购自 Dr. Eh 公司。

2.2 测定方法及步骤

液相色谱串联质谱法测定肠衣中 12 种磺胺类药物残留,前处理采用提取液提取浓缩、正己烷脱脂的方法。准确称取 5 g 混合均匀的肠衣样品,加入乙腈-无水硫酸钠混合提取液,均质 2 min;离心,上清液倒入 100 mL 鸡心瓶中,加入异丙醇旋转蒸发浓缩至干。残渣用流动相溶解,加入正己烷脱脂离心分层,弃去正己烷层。取下清液过 0.2 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

3 不确定度的评定

3.1 评定不确定度的数学模型

在相同条件下测定标准和样品的定容溶液,按下式计算样品中磺胺类药物残留的含量:

$$\omega = \frac{C \cdot V \times 1000}{M \times 1000}$$

ω 为试样中被测组分残留量,单位为 μg/kg; C 为从标准曲线中得到的被测组分溶液浓度,单位为 ng/mL; V 为试样溶液定容体积,单位为 mL; M 为最终样液所代表试样的质量,单位为 g。

上述计算公式是依据测量原理给出的,没有考虑各种随机因素对不确定度的影响。引入能够反映随机影响的重复性系数 $u_{rel}(\omega_{算})$,则评定不确定度的

数学模型应为如下形式: $\omega = \frac{C \cdot V \times 1000}{M \times 1000} \times u_{rel}(\omega_{算})$ 。

3.2 各分量标准不确定度的估算

实验中对测试结果有直接影响的仪器有分析天平和液相色谱-串联质谱仪,测试过程中所用到的量具和实验室的环境温度对结果也有一定的影响,样品的前处理,测试过程的随机效应以及标准溶液的配制对测试结果的不确定度也有较大的影响。以上不确定度的来源可归纳以下几个方面: A 类不确定度: ① 回收率产生的不确定度; ② 结果重复性产生的不确定度。B 类不确定度: ① 标准溶液配制产生的不确定度; ② 样品称量产生的不确定度; ③ 样品定容产生的不确定度。

3.2.1 标准溶液配制产生的不确定度

标准溶液配制产生的不确定度主要由标准品纯度、标准品称量、标准品配制定容、稀释因子等方面的因素来决定。

(1)标准品纯度引入的不确定度:以磺胺甲基异恶唑为例,由 Dr. Eh 公司提供的标准物质证书得其相对扩展不确定度为 0.5%,并指明包含因子 $k=2$,则由标准品纯度引入的不确定度为: $u_{rel(p)} = \frac{0.5\%}{2} = 0.0025$ 。

(2)标准品称量引入的不确定度: ① 天平校准产生的不确定度:十万分之一的天平,按检定证书给定的不确定度为 0.26 mg,按均匀分布,则校准产生的标准不确定度为: $u_1(m) = \frac{0.26 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 0.15 \text{ mg}$ ② 天

平重复性产生的不确定度:十万分之一的分析天平,最大允差为 0.01 mg,则由天平重复性产生的不确定度为: $u_2(m) = 0.5 \times 0.01 \text{ mg} = 0.005 \text{ mg}$ 。综上所述,由称量带来的标准不确定度为:

$u(m) = \sqrt{[u_1(m)]^2 + [u_2(m)]^2} = \sqrt{(0.15)^2 + (0.005)^2} \approx 0.15 \text{ mg}$, 则由标准品称量引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(m) = \frac{u(m)}{m} = 0.015。$$

(3)配制 100 mL 标准品溶液体积的标准不确定度:

① 容量瓶校准引入的不确定度:根据 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[6]给出的 100 mL 容量瓶 A 级容量允差为 ±0.10 mL,容量允差包括体积校准、重复性、人员读数,按照均匀分布:

$$u_1(V_{100}) = \frac{0.10 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.058 \text{ mL}。$$

②温度引入的不确定度: 在实验过程中, 溶液(乙腈)的温度与校正时的温度不同引起的体积不确定度为: $u_2(V_{100}) = \frac{0.41 \text{ mL}}{1.96} = 0.21 \text{ mL}$, 则 100 mL 容量瓶的合成标准不确定度为: $u(V_{100}) = \sqrt{[u_1(V_{100})]^2 + [u_2(V_{100})]^2} = \sqrt{(0.058)^2 + (0.21)^2} \approx 0.22 \text{ mL}$, 则相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(V_{100}) = \frac{0.22 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0.0022$ 。

(4) 1 mL 移液器引入的不确定度:

① 移液器校准引入的不确定度: 根据 JJG646—2006《移液器检定规程》^[7], 量程为 1 mL 的可调移液器吸取 1 mL 溶液时容量允许误差为 $\pm 1.0\%$, 则不确定度分量 $u_1(V_1) = \frac{1 \text{ mL} \times 1.0\%}{\sqrt{3}} = 0.00058 \text{ mL}$ 。

② 温度引入的不确定度: $u_2(V_1) = \frac{0.0041 \text{ mL}}{1.96} = 0.0021 \text{ mL}$ 。

则 1 mL 移液器的合成标准不确定度为: $u(V_1) = \sqrt{[u_1(V_1)]^2 + [u_2(V_1)]^2} = \sqrt{(0.00058)^2 + (0.0021)^2} \approx 0.0022 \text{ mL}$ 。

故 1 mL 移液器的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_1) = \frac{0.0022 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.0022$$

(5) 稀释过程中稀释因子带来的不确定度: 1: 100 稀释是用 1 mL 可调移液器和 100 mL 容量瓶来完成, 故稀释过程中稀释因子带来的不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(f_{100}) = \sqrt{\left[\frac{u(V_{100})}{V_{100}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_1)}{V_1}\right]^2} = \sqrt{\left[\frac{0.22 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right]^2 + \left[\frac{0.0022 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}\right]^2} \approx 0.0031 \text{ mL}$$

故标准溶液配制带来的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{std}}) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(m)]^2 + [u_{\text{rel}}(p)]^2 + [u_{\text{rel}}(V_{100})]^2 + [u_{\text{rel}}(f_{100})]^2} = \sqrt{(0.015)^2 + (0.0025)^2 + (0.0022)^2 + (0.0031)^2} \approx 0.016$$

3.2.2 样品称量带来的相对标准不确定度

天平校准产生的不确定度: $u_1(M) = \frac{1.0 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 0.577 \text{ mg}$; 天平重复性产生的不确定度 $u_2(M) = 0.5 \times 0.1 \text{ mg} = 0.05 \text{ mg}$; 称量带来的标准不确定度为:

$u(M) = \sqrt{[u_1(M)]^2 + [u_2(M)]^2} = \sqrt{(0.577)^2 + (0.05)^2} \approx 0.58 \text{ mg}$, 则由样品称量引入的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(M) = \frac{u(M)}{M} = \frac{0.58 \text{ mg}}{5064.5 \text{ mg}} \approx 0.00011$$

3.2.3 样品定容带来的相对标准不确定度

样品定容带来的相对标准不确定度, 主要由 1 mL 可调移液器引入, 与 3.2.1 中 1 mL 可调移液器标准不确定度的分析相同, 故计算过程简略; 因定容量为 2 mL 故得到样品定容带来的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{(0.0022)^2 + (0.0022)^2} = 0.003$$

3.2.4 回收率的标准不确定度

样品前处理带来的污染或损失、基质干扰、仪器进样、检测器响应等这类误差可以通过添加回收试验来考察。样品回收率的不确定度按 JJF1059—1999《测量不确定度评定与表示》^[4] 5.8 节计算, 以磺胺甲基异恶唑为例, 样品回收率的不确定度为: $u(f_{\text{rec}}) = \sqrt{\frac{(b_+ + b_-)^2}{12}} = \frac{(0.08 + 0.3)^2}{12} \approx 0.1096$ 。其中, b_+ 为最高回收率的偏差 ($b_+ = (108.0 - 100.0)\% = 8.0\%$), b_- 为最低回收率的偏差 ($b_- = (100.0 - 70.1)\% = 29.9\%$)。结果详见表 1。

表 1 样品回收率的相对标准不确定度

Table 1 Relative standard uncertainty of sample recovery

成分	回收率 (%)	$u(f_{\text{rec}})$	成分	回收率 (%)	$u(f_{\text{rec}})$
磺胺甲基异恶唑	70.1~108.0	11.0%	磺胺甲基嘧啶	82.1~105.6	5.4%
磺胺甲氧哒嗪	72.4~106.3	8.1%	磺胺氯哒嗪	81.8~108.2	5.8%
磺胺异恶唑	89.5~103.8	3.1%	磺胺苯吡唑	85.9~112.4	5.4%
磺胺邻二甲氧嘧啶	86.4~106.2	4.3%	磺胺二甲嘧啶	86.9~110.0	4.8%
磺胺噻唑	83.2~118.3	7.1%	磺胺嘧啶	88.1~109.4	4.4%
磺胺吡啶	87.2~108.6	4.5%	磺胺二甲基异恶唑	80.1~118.2	7.8%

3.2.5 结果重复性带来的不确定度

本实验测定了磺胺类药物添加量为 0.01 mg/kg 的猪肉样品, 称取相同样品 10 份, 同时进

行前处理后, 在相同的液相色谱-串联质谱条件下进行检测, 以磺胺甲基异恶唑为例, 样品分析结果如下:

表 2 平行样品添加回收数据(以磺胺甲基异恶唑为例)
Table 2 Data of sample recovery (sulfamethoxazole as an example)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
添加浓度(mg/kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
测定浓度(mg/kg)	0.0094	0.0108	0.0085	0.0074	0.0076	0.0094	0.0089	0.0093	0.0072	0.0070
平均浓度(mg/kg)	0.0085									

实验标准偏差按下式计算:

$$\omega = \frac{\sum \omega_i}{n} = \frac{0.0094 + 0.0108 + 0.0085 + 0.0074 + 0.0076 + 0.0094 + 0.0089 + 0.0093 + 0.0072 + 0.0070}{10} = 0.0085 \text{ mg/kg}$$

$$\text{单次测量的不确定度: } u(\omega_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\omega_i - \bar{\omega})^2}{n-1}} = 0.0012 \text{ mg/kg}$$

$$\text{算数平均值的 uncertainty: } u(\bar{\omega}_{\text{算}}) = \frac{u(\omega_i)}{\sqrt{n}} = 0.00038 \text{ mg/kg}$$

$$\text{相对不确定度: } u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_{\text{算}}) = \frac{u(\bar{\omega}_{\text{算}})}{\bar{\omega}} = 0.0447$$

3.3 合成标准不确定度

留含量 ω 的合成标准不确定度为:

以磺胺甲基异恶唑为例, 试样中磺胺类药物残

$$u(C_x) = \bar{C} \times \sqrt{[u_{\text{rel}}(C_{\text{std}})]^2 + [u_{\text{rel}}(M)]^2 + [u_{\text{rel}}(V)]^2 + [u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_{\text{算}})]^2 + [u_{\text{rel}}(f_{\text{rec}})]^2} = 0.0085 \times \sqrt{0.015^2 + 0.00011^2 + 0.003^2 + 0.0447^2 + 0.1096^2} = 0.0010$$

3.4 扩展不确定度

度为(0.0085±0.0020) mg/kg, 包含因子 $k=2$, 置信水平约为 95%。各影响因素详见表 3。

取包含因子 $k=2$, 置信水平约为 95%, 则磺胺甲基异恶唑的扩展不确定度为:

$$U(C_x) = k u(C_x) = 2 \times 0.0010 = 0.0020 \text{ mg/kg}。$$

从表 3 可以看出, 采用 GB/T 20759-2006 的方法测定肠衣中磺胺甲基异恶唑的添加回收量, 样品回收率对不确定度的影响起决定性作用。样品回收率的影响包括了样品前处理中提取、净化、基质干扰等各个方面。结果的重复性、样品定容和标准溶液的配制对不确定度有一定的影响。样品称量引起的不确定度的变化可以忽略不计。

4 结果与讨论

按 GB/T 20759-2006 测定肠衣中磺胺甲基异恶唑的残留量, 测定 10 份样品结果的平均值及其不确

表 3 各影响因素的相对标准不确定度
Table 3 Effect factors of the relative standard uncertainty

不确定度影响因素	标准溶液配制产生的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{std}})$	样品称量产生的不确定度 $u_{\text{rel}}(M)$	样品定容产生的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_1)$	回收率产生的不确定度 $u(f_{\text{rec}})$	结果重复性带来的不确定度 $u_{\text{rel}}(\bar{\omega}_{\text{算}})$
	0.015	0.00011	0.003	0.1096	0.0447

参考文献

- [1] 崔向云, 张雪峰, 袁凤琴, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中强力霉素残留的不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(2): 555-559.
Cui XY, Zhang XF, Yuan FQ, *et al.* Uncertainty evaluation of doxycycline in liquid milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(2): 555-559.
- [2] 张厚森, 武晓静, 王玮, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定猪肉中磺胺多辛的不确定度评定[J]. 食品工程, 2012, 3: 55-58.
Zhang HS, Wu XJ, Wang W, *et al.* Evaluation of uncertainty of sulfadoxine in pork by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Eng*, 2012, 3: 55-58.
- [3] 中国实验室国家认可委员会. 实验室认可与管理基础知识[M]. 北京: 中国计量出版社, 1999.
China National Accreditation Board For Laboratories. Basic knowledge of laboratory accreditation and management [M]. Beijing: China Meterage Press, 1999.
- [4] 国家质量技术监督局. JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.
State Bureau of Quality Technical Supervision. JJF 1059-1999 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S]. Beijing: China Meterage Press, 1999.
- [5] GB/T 20759-2006 畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 21317-2007 Determination of sulfanilamide residues in

food of animal origin-LC-MS/MS method and HPLC method [S].

- [6] 国家质量监督检验检疫总局. JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
State Bureau of Quality Technical Supervision Inspection and Quarantine. JJG196-2006 Verification regulation of the commonly used glass container [S]. Beijing: China Meterage Press, 2006.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. JJG646-2006 移液器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
State Bureau of Quality Technical Supervision Inspection and Quarantine. JJG196-2006 Verification regulation of pipette [S]. Beijing: China Meterage Press, 2006.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王 飞, 工程师, 主要研究方向为兽药残留检测。

E-mail: wangf@tjciq.gov.cn



陈其勇, 高级工程师, 主要研究方向为农兽药及食品添加剂多残留检测。

E-mail: chenqy@tjciq.gov.cn