

猪尿中盐酸克伦特罗测量结果不确定度的评价

熊波, 韩振亚, 苏焕斌, 刘辉*, 张燕

(广东产品质量监督检验研究院, 顺德 528300)

摘要: **目的** 提高液相色谱-质谱法测量猪尿中盐酸克伦特罗的准确度和可靠性。**方法** 建立液相色谱-质谱法测定猪尿中盐酸克伦特罗结果不确定度评定的数学模型, 综合分析测量过程中的不确定度来源, 同时对结果的不确定度进行分析。**结果** 液相色谱-质谱法测猪尿中盐酸克伦特罗引入不确定度的主要因素是仪器设备、标准曲线线性拟合和标准曲线系列配置。**结论** 在实际检测中可通过加强对实验仪器设备的维护保养、控制标准曲线校准过程和标准溶液的配制过程, 降低测量结果的不确定度。

关键词: 盐酸克伦特罗; 液相色谱-质谱法; 不确定度; 评价

Evaluation of the uncertainty in determination of clenbuterol hydrochloride residue in pig urine

XIONG Bo, HAN Zhen-Ya, SU Huan-Bin, LIU Hui*, ZHANG Yan

(Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shunde 528300, China)

ABSTRACT: Objective To improve the accuracy and reliability in the determination of clenbuterol hydrochloride in pig urine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Methods** The mathematical model was set up to evaluate the uncertainty of LC-MS method. The source of uncertainty and the result were comprehensively analyzed. **Results** The main factors of the uncertainty were instruments, standard curve linear fitting and standard curve series configuration. **Conclusion** The maintenance of experimental instruments, the control of preparation of standard curve and the standard solution calibration process can strengthen in actual detection to reduce the uncertainty of measurement results.

KEY WORDS: clenbuterol hydrochloride; liquid chromatography-mass spectrometry; uncertainty; evaluation

1 引言

盐酸克伦特罗(clenbuterol hydrochloride α -[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐), 为强效选择性 β_2 -肾上腺素受体激动剂, 因具有促进动物肌肉特别是骨骼肌蛋白的合成, 抑制脂肪的合成和积累, 从而能够改善动物体内脂肪分配, 增加瘦肉率,

因此盐酸克伦特罗亦称“瘦肉精”^[1-4]。然而研究发现盐酸克伦特罗易在肌肉特别是内脏中蓄积^[5,6], 从而导致一系列的食物中毒事件。为了防止由此而导致的食品安全事件^[7-10], 我国已严禁盐酸克伦特罗在饲料和畜牧业中使用, 并要求动物源食品中不得检出盐酸克伦特罗^[11]。在实际质量控制过程中, 质量部门主要通过采集活体样本的尿液进行盐酸克伦特

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B090600059)

Fund: Supported by Science and Technology Plan Project of Guangdong Province (2013B090600059)

*通讯作者: 刘辉, 工程师, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: lh403@163.com

*Corresponding author: LIU Hui, Engineer, Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shunde 528300, China. E-mail: lh403@163.com

罗的含量的测定,以保证动物源食品的安全性。因此,准确测定动物尿液中盐酸克伦特罗残留量具有重要的意义。

本研究选取猪尿中盐酸克伦特罗为对象,采用液相色谱-质谱法测定猪尿中克伦特罗的残留量,并对测定过程中不确定度进行分析^[12],以期对测量结果质量保证提供科学依据,并通过分析不确定度的主要影响因素,提供使不确定度其降低和减少的有效方式,从而提高测定结果的准确性和可靠性。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

盐酸克伦特罗标准溶液(购自标准物质中心,浓度为 100 μg/mL);阳性猪尿样品(实验室制备)。

2.2 仪器和设备

液相色谱质谱联用仪(LCMS-8030,日本岛津公司);分析天平(DJ302A+300,感量 0.01 g,昆山托普泰克电子有限公司)。

2.3 样品处理及标准曲线的测定

样品处理^[13]:按 GB/T 21313-2007《动物源性食品中 β-受体激动剂残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》对猪尿样品中克伦特罗的含量进行测定。其测定步骤参考 7.1 以及 7.2 条款说明。

标准曲线测定:吸取盐酸克伦特罗标准溶液 100 μL,用甲醇定容至 100 mL,配置成浓度为 100 ng/mL 的标准工作液。再用乙腈:甲酸(V:V)水溶液稀释至标准工作曲线。

2.4 分析条件

液相色谱条件: XBP-C₁₈(2)反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 0.05%甲酸水溶液:甲醇=90:10(V:V),梯度洗脱 8 min 后, 0.05%甲酸水溶液:甲醇=10:90;流速: 0.2 mL/min;柱温: 40 °C;进样量: 10 μL。

质谱条件:毛细管电压: 5000 V;锥形电压: 40 V;离子源温度: 400 °C

2.5 检测结果及环境原始记录

测定环境: 温度 18 °C;湿度(RH)47%;称样量 $m=5.0$ mL;样品定容体积 $V=1.0$ mL;样品测试液中盐酸克伦特罗的含量 $A=12.5$ ng/mL;样品中克伦特罗的含量 $X=1.25$ μg/L。

3 测定结果不确定度分析

3.1 测量数学模型

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

式中: X 为试样中克伦特罗的含量(μg/L); c 为标准工作溶液中被测组分的浓度(ng/mL); V 为样品定容体积(mL); m 为样品取样量(mL)。

3.2 不确定度来源分析

经过对测定步骤和数学模型的分析,影响猪尿中克伦特罗残留量检测结果不确定度因素有:样品量取过程中引入的不确定度、样品定容过程中引入的不确定度、标准工作液的稀释过程中引入的不确定度、标准曲线系列配置过程中引入的不确定度、样品重复测定过程中引入的不确定度、分析仪器设备测量过程中引入的不确定度、标准曲线拟合求样品测定液中克伦特罗含量 A 过程中引入的不确定度。

3.3 不确定度的量化

3.3.1 样品量取过程中的不确定度分析

测量过程中对样品的量取涉及到 1 次,采用校准为 A 级,最大允许差为 ±0.015 mL 的移液管,按照三角分布换算成相对标准偏差为: $u_{rel}(m)=0.015/(\sqrt{6} \times 5)=0.0012$ 。

3.3.2 样品定容过程中的不确定度分析

本实验于氮吹后的离心管中直接加入 0.5 mL 的甲醇-甲酸水溶液,混匀后用于测定,采用经校准合格的 200~1000 μL 移液器吸取 500 μL 的最大允许差为 ±5.0 μL,按照均匀分布换算成相对标准偏差为: $u_{rel}(V)=5/(\sqrt{3} \times 500)=0.0058$ 。

由于体积很小,容量温度与校正时温度不同引起的体积相对不确定度可忽略不计。

3.3.3 标准工作液的稀释过程中的不确定度分析

标准储备液的配置参考标准,吸取标准溶液 100 μL 用甲醇稀释至 100 mL,配置成 100 ng/mL 的标准工作液,再用 1:9 的乙腈:甲酸水溶液稀释至标准系列;稀释过程采用经校准合格的移液器 20~200 μL,吸取 100 μL 溶液是最大允许 ±2.0 μL,按照均匀分布换算成相对标准偏差为: $u(v)_1=2/(\sqrt{3} \times 100)=0.012$

用校准为 A 级的 100 mL 容量瓶定容,最大允许为 ±0.10 mL,按照三角分布换算成相对标准偏差为: $u_{rel}(v)=0.10/(\sqrt{6} \times 100)=0.00041$,相比用移液器吸取

100 μ L 可忽略不计; 因此标准工作液稀释过程的相对不确定度 $u_{rel}(s)=0.012$ 。

3.3.4 标准曲线系列配置过程中的不确定度分析

稀释过程采用经校准合格的 1~5 mL、200~1000 μ L、20~200 μ L 移液器分别移取配置的标准工作液 1000、500、200、100 mL 用 1:9 的乙腈: 甲酸水溶液定容至 10 mL, 在吸取 100 μ L 100 ng/mL 标准溶液用 1:9 的乙腈: 甲酸水溶液定容至 10 mL 配置 1.0 ng/mL 的标准系列, 该过程不确定度分析如表 1 所示:

由表 1 可知, 温度效应及定容引入的不确定度相对较小, 可忽略不计;

所有相对标准不确定度进行合并得到标准曲线系列配置过程中的相对标准不确定度为: $u_{rel}(s)=$

$$\sqrt{0.0029^2 + 0.0058^2 + 0.0058^2 + 0.0087^2 + 0.012^2} = 0.017$$

3.3.5 样品重复测定过程中的不确定度分析

本次测定过程中对样品独立进行了 3 次测量, 测定结果如下:

由表 2 中标准偏差按照正态分布(95%置信空间, $k=1.96$) 转化为相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(rep) = \frac{u_r}{k \times \sqrt{n}} = 0.0024$$

3.3.6 分析仪器设备测量过程中的不确定度分析

本次实验采用经校准合格的液相色谱-质谱联用仪, 校准证书给出该仪器定量重复性为 0.066, 按照均匀分布换算成相对标准不确定度为: $u_{rel}(d)=0.066/\sqrt{3}=0.038$

3.3.7 标准曲线线性拟合求样品测定液中克伦特罗含量 A 过程中的不确定度分析

由表 3 经过 Origin 拟合标准曲线得到回归方程: $Y=27833X+12129$, 线性相关系数 $r=0.9994$ 斜率和截距分别为 27833 和 12129。

由标准曲线峰面积测量的标准偏差为:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_j - (b \cdot x_i + a)]^2}{n-2}} = 8482$$

表 1 标准曲线系列配置过程不确定度分量一览表
Table 1 Uncertainty of preparation of standard solutions of clenbuterol hydrochloric

标准系列 (ng/mL)	移液体积 (μ L)	移液器的 最大允差(%)	移液相对标准 不确定度	温度效应导致 相对不确定度	定容体积 (mL)	容量瓶的最 大允差(mL)	定容相对不 确定度	温度效应导 致不确定度
20	2000	± 0.5	0.0029	0.00058	10.0	± 0.020	0.00082	0.00058
10	1000	± 1.0	0.0058	0.0058	10.0	± 0.020	0.00082	0.00058
5	500	± 1.0	0.0058	0.0058	10.0	± 0.020	0.00082	0.00058
2	200	± 1.5	0.0087	0.0058	10.0	± 0.020	0.00082	0.00058
1	100	± 2.0	0.012	0.0058	10.0	± 0.020	0.00082	0.00058

表 2 样品中克伦特罗测定结果
Table 2 Determination results of sample solution

测定次数	1	2	3	平均结果(μ g/L)	相对偏差
结果 $X(\mu$ g/L)	1.24	1.25	1.26	1.25	0.8

表 3 克伦特罗标准曲线拟合原始记录单
Table 3 Original record sheet of standard curve fitting

标准曲线系列浓度(ng/mL)	20	10	5	2	1
仪器响应值	5.63×10^5	3.02×10^5	1.53×10^5	6.71×10^4	3.32×10^4
样品处理液响应值	3.57×10^5	3.61×10^5	3.63×10^5	/	/

表4 不确定度分量一览表
Table 4 Table of each source of uncertainty

序号	不确定度分量的来源	不确定度分量的标示	类型	估计分布概率	包含因子 k	大小
1	样品量取的不确定度	$u_{rel}(m)$	B	均匀分布	$\sqrt{6}$	0.0012
2	样品定容的不确定度	$u_{rel}(V)$	B	三角分布	$\sqrt{6}$	0.0058
3	标准工作液稀释的不确定度	$u_{rel}(c)$	B	均匀分布和三角分布	$\sqrt{3}$ 和 $\sqrt{6}$	0.012
4	标准曲线系列配置的不确定度	$u_{rel}(s)$	B	三角分布	$\sqrt{6}$	0.017
5	样品重复测定的不确定度	$u_{rel}(r)$	A	正态分布	1.96	0.0024
6	分析仪器的不确定度	$u_{rel}(d)$	B	均匀分布	$\sqrt{3}$	0.038
7	标准曲线线性拟合的不确定度	$u_{rel}(A)$	B	/	/	0.020

式中: n 代表参与标准曲线的点的个数, 本次试验 $n=5$ 。

用该曲线对样品进行测定时, 样品出溶液平行测定两次, 即 $p=3$, 测的处理液中克伦特罗的最佳估计值 x_0 为 12.5 ng/mL, 样品测定标准偏差为:

$$u = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 0.25(\text{ng/mL})$$

式中: \bar{x} 为标准曲线所有浓度点的平均值; x_0 为处理溶液中克伦特罗的最佳估计值则标准曲线拟合过程中的相对标准偏差为: $u_{rel}(A)=0.25/12.5=0.20$ 。

3.4 不确定度的合成、扩展及标准化

根据表4分析, 样品量取、样品定容以及样品重复测定的不确定相对较小, 可忽略不计, 因此其他步骤分析过程引入的相对标准不确定度为: $u_{rel}(X)=\sqrt{0.012^2 + 0.017^2 + 0.038^2 + 0.020^2}=0.048$ 。

由于样品测定的结果为 1.68 $\mu\text{g/L}$, 因此其标准不确定度 $u(X)=0.048 \times 1.25=0.06(\mu\text{g/L})$

3.5 扩展不确定度及报告结果

猪尿中盐酸克伦特罗含量扩展不确定度, 按照国际惯例 95%置信概率, 取包含因子 $k=2^{[14]}$, 扩展不确定度为^[15]: $U(X)=u(X) \times k=0.06 \times 2=0.12(\mu\text{g/L})$; 最终结果可标示为: 盐酸克伦特罗含量 $x=1.25 \pm 0.12(\mu\text{g/L})$, $k=2$ 。

4 结论

本文讨论了猪尿中盐酸克伦特罗残留量的不确

定度评定方法, 定量表征了液相色谱-质谱法测定结果的可信程度, 评估了标准不确定度及扩展不确定度。通过计算和分析表明, 影响测量不确定度的主要因素是仪器设备引入的不确定度, 其次是标准曲线线性拟合引入的和标准曲线系列配置的不确定度。因此, 可通过加强对实验仪器设备的维护保养, 严格控制标准曲线校准过程和标准溶液的配制过程, 减小测量结果的不确定度。

参考文献

- [1] Zhang X, Zhao H, Xue Y, *et al.* Colorimetric sensing of clenbuterol using gold nanoparticles in the presence of melamine[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 34(1): 112–117.
- [2] Zhang GP, Wang XN, Yang JF, *et al.* Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist clenbuterol residues [J]. *J Immunol methods*, 2006, 312(1): 27–33.
- [3] He PL, Wang ZY, Zhang LY, *et al.* Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol [J]. *Food Chem*, 2009, 112: 707–714.
- [4] 侯仕农, 闫强, 马爱民. 盐酸克伦特罗的药理作用、对食品安全的危害和检测技术[J]. *内蒙古农业科技*, 2006, (6): 29–31.
Hou SN, Yan Q, Ma AM. The pharmacological effects, harm in food safety and inspection technology of Clenbuterol hydrochloride [J]. *Inner Mongolia Agric Sci Technol*, 2006, (6): 29–31.
- [5] Meza-Márquez OG, Gallardo-Velázquez T, Osorio-Revilla G, *et al.* Detection of clenbuterol in beef meat, liver and kidney by mid-infrared spectroscopy (FT-Mid IR) and multivariate analysis [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2012, 47(11): 2342–2351.

- [6] Sauer MJ, Pickett RJH, Limer S, *et al.* Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1995, 18(2): 81-86.
- [7] 何洁仪, 马林, 李迎月, 等. 广州市17起盐酸克伦特罗食物中毒分析及预防措施[J]. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(1): 54-55. He JY, Ma L, Li YY, *et al.* Analysis of 17 outbreaks of food poisoning by clenbuterol hydrochloride residue in Guangzhou [J]. *Chin J Food Hyg*, 2003, 15(1): 54-55.
- [8] 顾振华, 郑雷军. 上海盐酸克伦特罗食物中毒事件的分析与思考[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(1): 10-12. Gu ZH, Zheng LJ. Lessons from outbreak of food poisoning caused by clenbuterol in Shanghai [J]. *Chin J Food Hyg*, 2007, 19(1): 10-12.
- [9] 刘如春, 张锡兴, 陈田木, 等. 一起盐酸克伦特罗导致食物中毒事件调查[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(9): 1094-1096, 1091. Liu RC, Zhang XX, Chen TM, *et al.* Survey on a food poisoning incident caused by misuse or human poisoning of clenbuterol [J]. *Pract Pre Med*, 2013, 20(9): 1094-1096, 1091.
- [10] 曹艳平, 李红, 薛薇. 寿光市1起盐酸克伦特罗引起的食物中毒调查[J]. *预防医学论坛*, 2011, 17(5): 416-417. Cao YP, Li H, Xue W. Investigation on a food poisoning of clenbuterol in Shouguang city[J]. *Pre Med Tribune*, 2011, 17(5): 416-417.
- [11] Li ZY, Wang YH, Kong WJ, *et al.* Highly sensitive near-simultaneous assay of multiple "lean meat agent" residues in swine urine using a disposable electrochemiluminescent immunosensors array [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 19(1): 311-314.
- [12] JJF1059-1999 测量不确定度的评定与表示[S]. JJF1059-1999 Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement [S].
- [13] GB/T21313-2007 动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S]. GB/T21313-2007 Analysis of β -agonists in foods of animal origin by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [S].
- [14] 钱善华, 葛世荣, 吴兆宏. 扩展不确定度中包含因子的确定方法[J]. *中国计量学院学报*, 2005, 16(2): 112-115. Qian SH, Ge SR, Wu ZH. The methods of calculating the coverage factor in the expanded uncertainty [J]. *J China Inst Metrol*, 2005, 16(2): 112-115.
- [15] 袁玉静, 钱绍圣. 扩展不确定度分析与评定[J]. *中国计量学院学报*, 2004, 15(3): 181-185. Yuan YJ, Qian SS. Analysis and evaluation of expanded uncertainty [J]. *J China Inst Metrol*, 2004, 15(3): 181-185.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



熊波, 硕士, 主要研究方向为食品质量安全。

E-mail: xiongbo19892006@126.com



刘辉, 博士研究生, 食品质量工程师, 主要研究方向为食品安全与营养。

E-mail: lh403@163.com