

高效液相色谱-串联质谱法测定兔肉中氟苯尼考含量的不确定度评估

杨秀梅^{1*}, 刘养仲¹, 孙德刚², 逢淑梅¹, 宋明轩¹

(1. 青岛康大食品有限公司, 青岛 266400; 2. 黄岛出入境检验检疫局, 青岛 266400)

摘要: **目的** 评估高效液相色谱-串联质谱法测定兔肉中的氟苯尼考含量的不确定度。**方法** 依据 CNAS-GL06: 2006《化学分析中不确定度的评估指南》和 GB/T 20756-2006《可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》, 高效液相色谱-串联质谱法测定兔肉中氟苯尼考含量, 并对不确定度来源进行分析与量化。**结果** 兔肉中氟苯尼考含量为 0.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其扩展不确定度为 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $k=2$ 。**结论** 兔肉中氟苯尼考含量接近方法的测定低限时, 不确定度对样品的结果有重要参考作用, 因此在结果报告中, 应补充相应的不确定度。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 兔肉产品; 氟苯尼考; 不确定度

Assessment of the uncertainty in determination of florfenicol in rabbit meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YANG Xiu-Mei^{1*}, LIU Yang-Zhong¹, SUN De-Gang², PANG Shu-Mei¹, SONG Ming-Xuan¹

(1. Qingdao Kangda Foodstuff Co., Ltd., Qingdao 266400, China; 2. Huangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266400, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty in determination of the content of florfenicol in rabbit meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS). **Methods** According to the CNAS-GL06: 2006 "Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis" and GB/T 20756-2006 "Determination of multi-residues of chloramphenicols in the edible animal tissue, liver and Aquatic products", the main sources of the uncertainty resulted from the determination process of rabbit meat by HPLC-MS were discussed and calculated. **Results** The content of the florfenicol residue in rabbit meat was 0.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the extended uncertainty was 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $k=2$. **Conclusion** The content of the florfenicol in rabbit meat is around the detection limit. The uncertainty is very important for the sample result, so in the testing report, it is better to add the uncertainty of measurement.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; rabbit meat products; florfenicol; uncertainty

*通讯作者: 杨秀梅, 硕士, 中级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测, 食品、饲料等农兽药残留检测, 营养成分等理化检测。E-mail: yangxiumei123456@163.com

*Corresponding author: YANG Xiu-Mei, Qingdao Kangda Foodstuff Co., Ltd., Qingdao 266400, China. E-mail: yangxiumei123456@163.com

1 引言

在 CNAS-CL07 《测量不确定度的要求》中对检测实验室的要求中 8.2 条款中, 检测实验室应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估。尤其当不确定度与检测结果的有效性或应用有关、或客户要求、或其他相应条件时, 检测报告中必须提供测量结果的不确定度^[1]。食品检测中禁用药和限用药的检出限应尽可能低^[2], 临近方法的检出限的检测结果, 测量不确定度对其准确性和可靠性有重要影响, 因此, 接近检出限的样品检测结果的可用性很大程度上取决于其测量不确定度的大小。在样品检测报告中应包含被测量的值以及相关的测量不确定度, 才是完整并有意义的。目前高效液相色谱/串联质谱法已广泛用于兔肉产品中氟苯尼考的定性和定量检测。本研究依据 CNAS-GL06:2006 《化学分析中不确定度的评估指南》^[3], 对兔肉样品, 检测结果接近检出限, 对该样品中氟苯尼考测量结果进行不确定度测量和评定, 为科学评定测量结果质量提供依据。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

氟苯尼考标准品: Dr, 纯度 98%。

甲醇、乙酸乙酯、正己烷(色谱纯, 默克公司); 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团)。

液相色谱/串联质谱仪(API5500, AB Sciex 公司), 冷冻离心机(5804, 德国 Eppendorff)。

2.2 实验方法

称取样品 5 g, 置于 50 mL 离心管中, 添加内标, 加入乙酸乙酯和无水硫酸钠, 均质 1 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 再重复提取一次, 合并上清液, 旋蒸, 定容, 净化, 上机检测, 供液相色谱-串联质谱测定。详细方法及液相、质谱条件等参照 GB/T 20756-2006 《可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[4]。

2.3 不确定度评定过程

样品含量的计算公式:

$$X=c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1000}{1000}$$

X: 试样中被测物残留量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

c_s : 基质标准工作溶液中被测物的浓度, ng/mL ;

A: 试样溶液中被测物的色谱峰面积;

A_s : 基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;

c_i : 试样溶液中内标物的浓度, ng/mL ;

c_{si} : 基质标准工作溶液中内标物的浓度, ng/mL ;

A_{si} : 试样标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;

A_i : 试样溶液中内标物的色谱峰面积;

V: 样液最终定容体积, mL;

m: 试样溶液所代表试样的质量, g。

测量不确定度包括各种系统因素和随机因素的影响。在评定测量不确定度时必须考虑各种随机影响引入的不确定度分量。例如标准物质影响或天平、移液器等的影响, 因此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 $U_{\text{r}}(f_{\text{rep}})$ 就等于在重复性条件下重复测量某个量 X 所得到的一组观测值的相对标准不确定度 $U_{\text{r}}(x)$ 。这样就合并评定了各种随机影响引入的不确定度分量。评定不确定度的测量模型如下:

$$X=c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1000}{1000} f_{\text{rep}}$$

3 结果与分析

3.1 绘制校准曲线并检测

配制 5 个不同浓度的氟苯尼考浓度标准溶液, 每个浓度重复进样 2 次并记录色谱峰面积, 以保留时间为横坐标, 内外标的峰面积比值为纵坐标。标准曲线方程为: $Y=14.6X-0.0789$, 相关系数 $r=0.9997$ 。

在本次兔肉样品中氟苯尼考含量的测定中, 平行测定两份经净化的浓缩液。利用拟合曲线计算得到精制浓缩液浓度分别为 4.820 ng/mL 和 4.755 ng/mL , 平均值为 $C_s=4.788 \text{ ng}/\text{mL}$ 。1g 兔肉样品中氟苯尼考含量按公式计算: $X=4.788/5=0.958 \text{ ng}/\text{g}$ 。

3.2 不确定度分量的量化

不同的不确定度分量的量化可以利用实验室内部开发和确认研究中的数据。

3.2.1 测量重复性引入的相对标准不确定度

样品检测过程中会出现各种随机影响, 因此样品重复性检测次数越多, 所获得的检测重复性引入的标准偏差可靠性越高。查询以前氟苯尼考方法验证时, 1 ng/g 检出限平行测量的 12 份兔肉样品的添加回收结果(详见表 1), 按照贝塞尔公式计算单次测量的

表1 兔肉样品添加回收结果(氟苯尼考添加量 1 ng/g)
Table 1 The add recycling results of rabbit meat samples (additive amount of florfenicol is 1 ng/g)

| 回收 1 | 回收 2 | 回收 3 | 回收 4 | 回收 5 | 回收 6 | 回收 7 | 回收 8 | 回收 9 | 回收 10 | 回收 11 | 回收 12 |
|--------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4.895 | 4.915 | 4.94 | 4.899 | 5.032 | 5.027 | 4.975 | 4.893 | 4.915 | 4.963 | 4.905 | 5.092 |
| 4.9542 | | | | | | | | | | | |

标准偏差 $s(C_{op})=0.6526$ ng/g。单次测量的重复性相对标准偏差: $s_r(C_{op})=s(C_{op})/C_{op}=0.6526/4.95=0.1317$ 。

因上述检测结果中已经合并了各种随机因素的影响,如人员操作、环境温度、样品均匀性以及仪器设备的读数偏差等,在随后进行的不确定度分量评定时不再考虑各种随机因素的影响。

在本次检测中利用原来在相同测量中所得的单次测量的预评估的重复性相对标准偏差,计算本次检测结果平均值的重复性相对标准偏差。

本次对兔肉样品进行了2次平行测定,两次测量结果平均值的重复性相对标准偏差为: $U_r(\bar{x})=U_r(\text{frep})=0.1317/\sqrt{3}=0.09314$ 。

3.2.2 回收率不确定度

在最初的方法验证中做过3个浓度梯度的添加回收实验,每个梯度添加回收3份,回收率在95%~103%之间,平均回收率 Rec 为 98.9%, $S(\text{Rec})=2.32\%$, 单次测量的回收率的相对标准不确定度为:

$$U_R = \frac{S}{R\sqrt{n}} = \frac{2.32\%}{98.9\% \times \sqrt{9}} = 0.00782。$$

3.2.3 称量不确定度

称量的不确定度来源主要为重复性以及天平校准产生的不确定度分量,天平的校准有两个潜在的不确定度来源,即天平的灵敏度和线性,因称量时在同一天平,在很窄范围内,灵敏度可以忽略不计,仅考虑线性引入的不确定度。

标准品称量:天平使用梅特勒-托利多,检定证书给出的最大允许误差 ± 0.1 mg,取均匀分布,其标准不确定度为 $U=0.1/\sqrt{3}=0.0577$ mg。减量法称量,因为每一次称重均为独立的观测结果,两者的线性影响是不相关的,产生的不确定度为 $U=2 \times 0.0577=0.3397$ mg,天平称量重复性偏差为 0.05 mg,减量法称量,因此对照品由重复性以及线性分量构成称量的不确定度为 $U_c = \sqrt{0.3397^2 + 0.05^2} = 0.3434$ mg,引入的相对标准不确定度: $U_{m1} = \frac{0.3434}{10} = 0.03434$ 。

样品称量:天平使用 Metter Toledo PL202,允差为 ± 0.1 g,取均匀分布: $U=0.1/\sqrt{3}=0.05773$ g;天平称量重复性偏差为 0.1 g,减量法称量,因此样品称量由重复性以及线性分量构成称量的不确定度为 $U_c = \sqrt{0.05773^2 + 0.1^2} = 0.1154$ g,引入的相对标准不确定度: $U_{m2} = \frac{0.1154}{5} = 0.02308$ 。

因此称量引入的相对不确定度合成为:

$$U_m = \sqrt{0.03434^2 + 0.02308^2} = 0.0414。$$

3.2.4 标准物质引入的不确定度

3.2.4.1 标准品纯度引入的不确定度

氟苯尼考标准品纯度 98%,纯度误差为 $\pm 0.5\%$,按矩形分布处理,其标准不确定度为: $U(C_s)=0.5\%/\sqrt{3}=0.29\%$;相对标准不确定度为: $U_{rel}(C_s)=0.29\%/98\%=0.0030$ 。

3.2.4.2 配制标准储备液及工作液所引入的不确定度

① 1000 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备溶液的配制。

因称量标准品所引入的不确定度在质量中已经计入,则不重复计入,仅需考虑 10 mL 容量瓶所带来的不确定度影响。根据玻璃仪器检定规程^[5],20 $^{\circ}\text{C}$ 时 10 mL 容量瓶(A级)的容量允差为 ± 0.02 mL,取均匀分布,则不确定度为 $0.02/\sqrt{3}=0.01155$ mL;重复性:对 10 mL 容量瓶充满 6 次并称量,标准偏差 $s=0.0012$ mL;温度:实验室温度在 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 范围内波动,乙腈的体积膨胀系数为 $1.37 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$,取均匀分布,不确定度为 $1.37 \times 10^{-3} \times 5 \times 10 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.03955$ mL。合成得 10 mL 容量瓶的相对不确定度为:

$$U_{cl} = \sqrt{0.01155^2 + 0.0012^2 + 0.03955^2} / 10 = 0.00412。$$

② 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 标准物质的配制:需要使用 0.1 mL 移液器,分别定容到 10 mL 容量瓶中。

0.1 mL 移液器:JJG 646-2006《移液器检定规程》^[6]中规定:100 μL 移液器吸取 0.1 mL 溶液容量允许差为 2.0%,其不确定度为 $0.1 \times 2\% / \sqrt{3} = 0.001155$ mL,测量重复性标准差 1.0%,按矩形分布处理,

$0.1 \times 1\% / \sqrt{3} = 0.000577 \mu\text{L}$ 。温度:实验室温度在 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内波动,乙腈的体积膨胀系数为 $1.37 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$,取均匀分布,不确定度为 $1.37 \times 10^{-3} \times 5 \times 0.1 / \sqrt{3} = 0.0003955$,温度影响可忽略不计。相对标准不确定度为:

$$U_{c2} = \sqrt{0.001155^2 + 0.000577^2} / 0.1 = 0.0129。$$

③配制 1、2、4、8、10 ng/mL 标准工作曲线,分别用 100、200、400、800、1 mL 移液器。

1 mL 移液器:JJG 646-2006 《移液器检定规程》中规定:1000 μL 移液器吸取 1 mL 溶液容量允许差为 1.0%,其不确定度为 $1\% / \sqrt{3} = 0.00577 \mu\text{L}$,测量重复性标准差 0.5%,按矩形分布处理, $0.5\% / \sqrt{3} = 0.00289 \mu\text{L}$ 。温度:实验室温度在 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内波动,乙腈的体积膨胀系数为 $1.37 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$,取均匀分布,不确定度为 $1.37 \times 10^{-3} \times 5 \times 1 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.003955 \mu\text{L}$ 。标准不确定度为:

$$U_{c2} = \sqrt{0.001155^2 + 0.000577^2} / 0.1 = 0.0129。$$

以此类推,其他的 100、200、400、800 μL 移液器引起的不确定度分别为 0.0129、0.0134、0.0115、0.00806。

实验过程中使用了 3 次 10 mL 容量瓶和 3 次 0.1 mL 移液器,则配制标准品所引入的体积不确定度为

$$U_{\text{标}} = \sqrt{0.0030^2 + 0.00412^2 + 0.0129^2 + 0.00757^2 + 0.0129^2 + 0.0115^2 + 0.00806^2} = 0.0247。$$

3.2.5 体积引入的不确定度

3.2.5.1 定容体积引入的不确定度

样品经过萃取、净化后用 1 mL 移液器移取 3 mL 水溶液溶解,根据 JJG 646-2006 中要求,按矩形分布处理,标准不确定度为 $1\% / \sqrt{3} = 0.00577$,使用了 3 次,其相对不确定度为

$$U_{\text{rel}(V3)} = \sqrt{3 \times 0.00577^2} = 0.00999。$$

3.2.5.2 进样体积引入的不确定度

测试中仪器配制的微量注射器体积为 25 μL ,进样量为 10 μL ,根据 JJG 700-1999 附录 A 微量注射器的标准^[7],微量注射器体积的相对标准偏差为 1%,按矩形分布处理,则进样体积引入的相对标准不确定度为: $U_{\text{rel}(Inj)} = 1\% / \sqrt{3} = 0.0058$ 。

综合起来,体积引入的相对不确定度合成为:

$$U_V = \sqrt{0.00999^2 + 0.0058^2} = 0.0115。$$

3.2.6 拟合曲线不确定度

配制一系列氟苯尼考标准溶液,浓度分别为 1、2、4、8、10 ng/mL,拟合曲线为 $Y = 14.6X - 0.0789$, $r^2 = 0.9998$,样品测定 2 次的含量均值为 $m_0 = 4.788 \mu\text{g}/\text{kg}$,拟合曲线的相对不确定度为:

$$S(C_s)_1 = \frac{s(y)}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}}。$$

其中 p —试样平行测量次数; n —拟合曲线的数据对总数;

y —试样测量响应值(p 个)的平均值; c_i —绘制拟合曲线用某标准溶液浓度值, c_s —从拟合直线上测得的精制浓缩液浓度平均值;

$$\text{其中 } S(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - (bc_i + a))^2}{n-2}} = 5.162;$$

$$S(C_s) = 0.379 \text{ ng/mL}。$$

由最小二乘法拟合标准工作曲线引入的相对标准不确定度为 $U(C_s) = S(C_s)/C = 0.0792 \text{ ng/mL}$ 。

3.3 相对合成标准不确定度及扩展不确定度

将各分量合成,相对合成不确定度为:

$$U = \sqrt{0.09314^2 + 0.00782^2 + 0.0414^2 + 0.00247^2 + 0.0115^2 + 0.0792^2} = 0.122。$$

实验结果一般用扩展不确定度来表示。取包含因子 $k = 2$ (置信区间 95%),得扩展不确定度: $U = xu_{C_{\text{rel}}}(X)$ $k = 0.958 \times 0.122 \times 2 = 0.23 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

4 结论

兔肉中氟苯尼考的测量结果为: $C_x = (0.96 \pm 0.23) \mu\text{g}/\text{kg}$, $k = 2$ 。

通过以上不确定度评估过程,所得的不确定度 $0.23 \mu\text{g}/\text{kg}$ 对检测结果,尤其是该份样品氟苯尼考的检出结果临近检出限,所以当样品的检测结果接近检出限时,应附加不确定度评估,以供客户对该结果进行评价。

参考文献

- [1] CNAS-CL07:2011 测量不确定度的要求[S]. CNAS-CL07:2011 Requirements for measurement uncertainty [S].
- [2] GB/T27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]. GB/T27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

- [3] CNAS-GL06:2006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL06:2006 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [4] GB/T 20756-2006 可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20756-2006 Determination of multi-residues of chloramphenicols in the edible animal tissue, liver and aquatic products [S].
- [5] GB 12806-1991 实验室玻璃仪器单标线容量瓶[S].
GB 12806-1991 Laboratory glassware-One-mark volumetric flasks [S].
- [6] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].
- [7] JJG700-1999 气相色谱仪检定规程[S].
JJG700-1999 Verification regulation of gas chromatograph [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



杨秀梅, 硕士, 中级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测, 食品、饲料等农兽药残留检测, 营养成分等理化检测。

E-mail: yangxiumei123456@163.com