

高效液相色谱法测定牛奶中甲砒霉素 残留量的不确定度评定

孙 婧, 刘晓海*

(蒙牛乳制品武汉有限责任公司, 武汉 430040)

摘 要: **目的** 评定高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定牛奶中甲砒霉素残留量的不确定度。**方法** 根据 GB29689-2013《食品安全国家标准牛奶中甲砒霉素残留量的测定高效液相色谱法》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》, 建立分析 HPLC 测定牛奶中甲砒霉素残留量不确定度的数学模型, 通过对整个测定过程中的不确定度来源进行分析和合成, 运用最小二乘法对甲砒霉素标准曲线拟合的不确定度进行评定。**结果** 当取样量为 5.00 g, $k=2$ (95%置信度)时, 测得甲砒霉素理论含量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的牛奶中甲砒霉素的残留量为 (91.4 ± 2.2) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 本方法的主要不确定来源为标准溶液浓度、标准曲线拟合以及试样测量重复性。

关键词: 不确定度; 高效液相色谱法; 甲砒霉素; 牛奶

Uncertainty evaluation of the determination of thiamphenicol residues in milk by high performance liquid chromatography

SUN Jing, LIU Xiao-Hai*

(Mengniu Dairy products Wuhan Co., Ltd., Wuhan 430040, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of thiamphenicol residues in milk by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** According to GB29689-2013 *National standard for food safety-Determination of thiamphenicol residues in milk-High performance liquid chromatography* and JJF 1059.1-2012 *Measurement and expression of measurement uncertainty*, the mathematical model for the determination of the uncertainty of thiamphenicol residues in milk by HPLC was established. The uncertainty of the fitting of the standard curve of thiamphenicol was assessed by least squares method by analyzing and synthesizing the sources of uncertainty throughout the assay. **Results** When the sample was 5.00 g, $k=2$ (95% confidence), the result of determination of the residual amount of thiamphenicol in milk with a theoretical content of thiamphenicol of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was (91.4 ± 2.2) $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The main sources of uncertainty for this method include standard solution concentration, standard curve fit, and sample measurement repeatability.

KEY WORDS: uncertainty; high performance liquid chromatography; thiamphenicol; milk

*通讯作者: 刘晓海, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测与控制

*Corresponding author: Liu Xiao-Hai, Master, Assistant Engineer, Mengniu Dairy products Wuhan Co., Ltd., No.203, ZhangbaiRoad, Dongxihu District, Wuhan 430040, China. E-mail: liuxiaohai@mengniu.cn

1 引 言

随着人们生活水平的日益提高, 对饮食营养与身体健康也越加关注, 牛奶成为了人们日常饮食中不可或缺的饮品, 随之而来的, 就是奶牛养殖与牛奶加工产业的迅猛发展。作为这些产业链的源头, 奶牛本身的健康则是重中之重。在奶牛养殖中, 抗生素的合理使用, 对奶牛疾病治疗和机体恢复起到了至关重要的作用, 与此同时, 抗生素在牛体内的蓄积以及药物残留产生的有抗奶, 影响食用者的身体健康^[1-3]。

甲砒霉素(thiamphenicol), 又称硫霉素、甲砒氯霉素, 是氯霉素的甲砒衍生物, 为白色到类白色结晶性粉末或晶体, 是氯霉素类第 2 代广谱抗菌药, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较强的抑制作用, 同时具有较强的免疫抑制作用, 较氯霉素强约 6 倍, 可抑制免疫球蛋白合成和抗体合成。然而随着对甲砒霉素的研究逐步深入, 发现甲砒霉素在产生抗菌作用的同时对生物体也具有一定的毒副作用, 用药不当或长期用药可能会使人体产生可逆性骨髓抑制、再生障碍性贫血、灰婴综合征、肝毒性、周围神经炎和视神经炎、过敏等不良反应^[4-13]。

随着人们对食品安全问题的越发重视, 牛奶中甲砒霉素的残留量也引起许多国家食品安全检验单位的注意。目前检测牛奶中甲砒霉素使用的是 GB29689-2013《食品安全国家标准牛奶中甲砒霉素残留量的测定高效液相色谱法》^[14], 为了评估该方法中对检测结果影响较大的因素, 指导检测过程, 尽量减小和避免这些因素对检测结果造成的干扰, 本研究根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[15]的要求, 对该方法测定结果的不确定度进行评定, 以期确定影响检测结果不确定的各种因素, 为评定检测结果的可靠程度提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

甲砒霉素阳性试样: 以经空白实验验证其中不含甲砒霉素的市售新鲜纯牛奶为本底, 使用甲砒霉素标准储备液对其进行理论浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标。

甲砒霉素标准品(99.9%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司生产); 乙酸乙酯、正己烷(色谱纯, 天津市福晨化学试剂厂); 乙腈(色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限责任公司); Sep-Pak Vac 6cc C_{18} 固相萃取柱(500 mg, 爱尔兰 Waters 公司); SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 日本资生堂 SHISEIDO 公司)。

2.2 仪器与设备

Ultimate3000 高效液相色谱仪(配有紫外检测器, 赛

默飞世尔(上海)仪器有限公司); XP205DR 分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); MS 3D S25 漩涡振荡器(广州仪科实验室技术有限公司); Elmasonic E 100H 超声波清洗机(广州得翔科技有限公司); Neofuge 23R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); RV 10 basic 旋转蒸发器(广州仪科实验室技术有限公司); 5185-5765 固相萃取装置(美国安捷伦科技公司); 5085 氮气吹干仪(美国 Organomation Associates 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制

2.3.2 试样制备

称取 5.00 g 加标试样于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20 mL 乙酸乙酯, 漩涡振荡 10 min, 4000 r/min 离心 5 min。取上清液于鸡心瓶中, 残渣中加入 20 mL 乙酸乙酯, 重复提取 1 次, 合并 2 次提取液, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 加 5 mL 水于鸡心瓶中, 超声 5 min 使充分溶解, 转至 50 mL 离心管中, 再加 5 mL 水于鸡心瓶中重复溶解后转至同一离心管中; 加 20 mL 正己烷于鸡心瓶中, 振荡 5 min, 转至同一离心管中, 4000 r/min 离心 2 min。 C_{18} 固相萃取柱依次用 5 mL 乙腈、5 mL 水活化后, 取离心好的全部下层液过柱, 控制流速 1 mL/min, 挤干后用 5 mL 乙腈洗脱, 收集洗脱液, 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 1 mL 流动相溶解残余物, 漩涡振荡 1 min, 0.45 μm 有机滤膜过滤后上机^[14]。

2.3.3 色谱条件

色谱柱: SHISEIDO CAPCELLPAK C_{18} AQ 色谱柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 μm)柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测器: 紫外检测器; 波长: 225 nm; 流动相: 乙腈+水(20:80, V/V); 流速: 1.0 mL/min; ; 进样量: 20 μL ^[14]。

2.3.4 数学模型的建立

甲砒霉素的残留量计算公式为:

$$X = \frac{CV}{m} \quad (1)$$

式(1)中: X 为试样中甲砒霉素的残留量($\mu\text{g}/\text{kg}$); C 为试样溶液中甲砒霉素的浓度(ng/mL); V 为溶解残余物流动相的体积(mL); m 为供试试样质量(g)。

由于 GB29689-2013《食品安全国家标准牛奶中甲砒霉素残留量的测定高效液相色谱法》^[14]是使用标准曲线法对试样中甲砒霉素残留量进行定性和定量检测, 所以试样测定结果的不确定度除 C 、 V 、 m 外, 标准曲线、试样测量重复性、仪器进样重复性和回收率都对测定结果产生影响^[16]。

则(1)式可转化为:

$$X = \frac{CV}{m \times R} \times f_{\text{重}} \times f_{\text{校}} \quad (2)$$

式(2)中: R 为回收率, $f_{\text{重}}$ 为重复性修正因子, $f_{\text{校}}$ 为校正曲线

拟合修正因子。

3 结果与分析

3.1 不确定度来源分析

从测量过程和数学模型分析, 试样测定的相对标准不确定度主要由标准溶液配制 $u_{\text{rel}}(C)$ 、试样称量 $u_{\text{rel}}(m)$ 、试样定容 $u_{\text{rel}}(V)$ 、试样测量重复性 $u_{\text{rel}}(\bar{X})$ 、仪器进样重复性 $u_{\text{rel}}(\bar{Q})$ 、标准曲线拟合 $u_{\text{rel}}(C_0)$ 这几个方面引入。

3.2 各分量相对标准不确定度的评定

3.2.1 标准溶液配制引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$

标准溶液由甲砒霉素对照品经过称量、定容、稀释配制而成, 所以标准溶液配制的相对标准不确定度由对照品纯度、天平称量、标准储备液定容、标准工作液稀释过程引入。

(1) 对照品纯度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_1)$

由甲砒霉素对照品证书可知, 纯度为 99.9%, 包含因子 $k=2$ 时, 在 95%置信区间上扩展不确定度 $U=0.5\%$, 则引入的其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C_1) = \frac{0.5\%}{2 \times 99.9\%} = 0.002503 \quad (3)$$

(2) 天平称量引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_2)$

称取甲砒霉素对照品使用的电子天平的检定证书给出在 $d=0.01 \text{ mg}$ 、 $0 \leq m \leq 5 \text{ g}$ 条件下, 其最大允许误差为 $\pm 0.05 \text{ mg}$, 按矩形分布考虑, 其引入的标准不确定度为:

$$u(c_2) = \frac{0.05 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 0.02887 \text{ mg}$$

精确称量 10 mg 甲砒霉素对照品, 其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_2) = \frac{0.02887 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} = 0.002887 \quad (4)$$

(3) 标准储备液定容引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_3)$

使用 10 mL 容量瓶定容甲砒霉素标准储备液, 依据 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[17], 20 °C 时 10 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为 $\pm 0.020 \text{ mL}$, 按三角分布考虑, 其标准不确定度为:

$$u(c_{V1}) = \frac{0.020 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0.008165 \text{ mL}$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{V1}) = \frac{0.008165 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.0008165 \quad (5)$$

甲砒霉素标准储备液由乙腈配制而成, 20 °C 时玻璃的体积膨胀系数为 $2.5 \times 10^{-5}/^\circ\text{C}$ ^[18], 乙腈的体积膨胀系数为 $1.4 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$ ^[19], 假设 10 mL 容量瓶的使用温度与室温一致, 实验时室温为 22.7 °C, 则由校准温度与使用温度不同引入的体积不确定值为:

$$\Delta V = V_1 - V_2 = (\alpha_{\text{乙腈}} - \alpha_{\text{玻璃}}) \times V \times \Delta T = 0.03712 \text{ mL}$$

按三角分布考虑, 使用 10 mL 容量瓶时, 其标准不确定度为:

$$u(c_{T1}) = \frac{0.03712 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0.01515 \text{ mL}$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{T1}) = \frac{0.01515 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.001515 \quad (6)$$

由式(5)、(6), 合成标准储备液定容的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_3) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_{V1})^2 + u_{\text{rel}}(c_{T1})^2} = 0.001721 \quad (7)$$

(4) 标准工作液稀释 $u_{\text{rel}}(C_4)$

标准工作液由标准储备液先稀释成标准中间液, 再由标准中间液分别稀释配制而成, 使用了规格分别为 2~20 μL 、5~50 μL 、10~100 μL 、20~200 μL 、100~1000 μL 的移液器和 10 mL 容量瓶。

依据移液器校准证书, 当 $k=2$ 时, 这 5 种规格移液器的扩展不确定度依次为 $U_{(20 \mu\text{L})}=0.2 \mu\text{L}$ 、 $U_{(50 \mu\text{L})}=0.2 \mu\text{L}$ 、 $U_{(100 \mu\text{L})}=0.2 \mu\text{L}$ 、 $U_{(200 \mu\text{L})}=0.4 \mu\text{L}$ 和 $U_{(1000 \mu\text{L})}=0.4 \mu\text{L}$, 则其标准不确定度分别为:

$$u(c_{20 \mu\text{L}}) = \frac{0.2 \mu\text{L}}{2} = 0.1 \mu\text{L}$$

$$u(c_{50 \mu\text{L}}) = \frac{0.2 \mu\text{L}}{2} = 0.1 \mu\text{L}$$

$$u(c_{100 \mu\text{L}}) = \frac{0.2 \mu\text{L}}{2} = 0.1 \mu\text{L}$$

$$u(c_{200 \mu\text{L}}) = \frac{0.4 \mu\text{L}}{2} = 0.2 \mu\text{L}$$

$$u(c_{1000 \mu\text{L}}) = \frac{0.4 \mu\text{L}}{2} = 0.2 \mu\text{L}。$$

其各自相对标准不确定度见表 1。

表 1 标准系列配制过程中移液器校准引起的不确定度
Table 1 Uncertainty aroused from errors in calibration of pipettes used in preparation of standard series

标准工作液浓度/($\mu\text{g/mL}$)	使用移液器规格/ μL	移取体积/ μL	标准不确定度/ μL	相对标准不确定度(u_{rel})
10	10-100	100	0.1	0.001
0.02	2-20	20	0.1	0.005
0.05	5-50	50	0.1	0.002
0.125	20-200	125	0.2	0.0016
0.25	100-1000	250	0.2	0.0008
0.5	100-1000	500	0.2	0.0004

由以上数据合成的移液器相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{移}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_{100 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{20 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{50 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{125 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{250 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{500 \mu\text{L}})^2}$$
$$u_{\text{rel}}(c_{\text{移}}) = 0.005776 \quad (8)$$

使用 10 mL 容量瓶配制标准工作液, 依据 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[17], 20 ℃时 10 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为±0.020 mL, 按三角分布考虑, 其标准不确定度为:

$$u(c_{V2}) = \frac{0.020 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0.008165 \text{ mL}$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{V2-10 \text{ mL}}) = \frac{0.008165 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.0008165 \quad (9)$$

甲砒霉素标准工作液由 20%乙腈水配制而成, 20 ℃时玻璃的体积膨胀系数为 $2.5 \times 10^{-5}/^{\circ}\text{C}$ ^[18], 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}\text{C}$ ^[20], 乙腈的体积膨胀系数为 $1.4 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ ^[19], 则 20%乙腈水的平均体积膨胀系数为 $2.2 \times 10^{-4}/^{\circ}\text{C}$ 。假设 10 mL 容量瓶的使用温度与室温一致, 实验时室温为 22.7 ℃, 则由校准温度与使用温度不同引起的体积不确定值为:

$$\Delta V = V_1 - V_2 = (\alpha_{\text{平均}} - \alpha_{\text{玻璃}}) \times V \times \Delta T = 0.005265 \text{ mL}$$

按三角分布考虑, 则使用 10 mL 容量瓶时, 其标准不确定度为:

$$u(c_{T2}) = \frac{0.005265 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0.002149 \text{ mL}$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{T2-10 \text{ mL}}) = \frac{0.002149 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.0002149 \quad (10)$$

由式(8)、(9)、(10), 合成标准工作液稀释过程的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_4) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_{\text{移}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{V2-10 \text{ mL}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{T2-10 \text{ mL}})^2} = 0.005837 \quad (11)$$

由式(3)、(4)、(7)、(11), 合成标准溶液配制的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_1)^2 + u_{\text{rel}}(c_2)^2 + u_{\text{rel}}(c_3)^2 + u_{\text{rel}}(c_4)^2} = 0.00719 \quad (12)$$

3.2.2 试样称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$

待测试样同样使用十万分之一天平进行称量, 根据电子天平检定证书, 在 $d=0.1 \text{ mg}$ 、 $0 \leq m \leq 50 \text{ g}$ 条件下, 其最大允许误差为±0.5 mg, 按矩形分布考虑, 其标准不确定

度为:

$$u(m) = \frac{0.5 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 0.2887 \text{ mg}$$

称取试样的质量为 5.0089 g, 其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{0.2887 \text{ mg}}{5.0089 \times 1000 \text{ mg}} = 0.0000576 \quad (13)$$

3.2.3 试样定容引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$

使用 100~1000 μL 移液器移取 1000 μL 流动相定容试样, 依据移液器校准证书, 当 $k=2$ 时, $U=0.4 \text{ μL}$, 则其标准不确定度为:

$$u(v) = \frac{0.4 \text{ μL}}{2} = 0.2 \text{ μL}$$

则其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(v) = \frac{0.2 \text{ μL}}{1000 \text{ μL}} = 0.0002 \quad (14)$$

3.2.4 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_0)$

测定过程中采用 10 μg/mL 的甲砒霉素标准中间液配制浓度分别为 20、50、125、250、500 μg/L 的标准工作液, 将这 5 个浓度的标准工作液分别上机检测 6 次, 测得的峰面积结果见表 2。

采用最小二乘法拟合, 得到标准曲线的线性回归方程为:

$$Y = bX + a = 0.0004692X - 0.001479,$$

相关系数 $r = 0.9997$,

其中: $b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} = 0.0004692$,

$$A = \bar{Y} - B\bar{X} = -0.001479$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = 0.9997$$

峰面积测量的标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n v_i^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - (a + bX_i)]^2}{n-2}} = 0.001964$$

应用该曲线进行测量时, 对被测试样检测 10 次, 即 $p=10$, 测得试样中甲砒霉素的浓度见表 3。

表 2 标准曲线拟合数据
Table 2 Data of fitting calibration curve

标准工作液浓度 /(μg/L)	标准峰面积 A ₁	标准峰面积 A ₂	标准峰面积 A ₃	标准峰面积 A ₄	标准峰面积 A ₅	标准峰面积 A ₆	平均标准峰面 积 A _s
20	0.0088	0.0093	0.0091	0.0097	0.0096	0.0099	0.0094
50	0.0214	0.0219	0.0214	0.0219	0.0217	0.0215	0.0216
125	0.0573	0.0586	0.0582	0.0589	0.0566	0.0585	0.0580
250	0.1119	0.1125	0.1128	0.1125	0.1124	0.1124	0.1124
500	0.2342	0.2353	0.2350	0.2344	0.2344	0.2345	0.2346

表 3 样液中甲砒霉素浓度结果
Table 3 Results of thiamphenicol concentration in sample solution

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度结果/(μg/L)	466.3	463.5	447.5	448.0	465.2	461.4	450.5	449.4	466.9	452.6

表 4 重复测量结果
Table 4 Data of repeat determination in sample

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
测定结果/(μg/kg)	93.2	92.7	89.5	89.4	93.0	92.2	90.0	89.8	93.3	90.4	91.4
回收率/%	93.20	92.70	89.50	89.40	93.00	92.20	90.00	89.80	93.30	90.40	91.40

由表 3 计算, 试样中甲砒霉素的平均浓度为 457.1 μg/L, 试样质量以 5.00 g 计, 按式(1)得到的试样中甲砒霉素的最佳估计值为 91.4 μg/kg。

校准曲线拟合的标准不确定度为:

$$u(c_0) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{c}_0 - \bar{c})^2}{S_{XX}}} = 1.53 \text{ μg/L}$$

式中: S 为峰面积测量的标准偏差, 数值为 0.001964; b 为校准曲线的斜率数值为 0.0004692; p 为试样测定次数, 数值为 10; n 为校准溶液的测定次数, 数值为 30; S_{XX} 为标准溶液浓度残差的平方和, 数值为 914520; $\bar{c}_0$ 为试样中甲砒霉素的平均浓度, 数值为 457.1 μg/L; $\bar{c}$ 为标准溶液的平均浓度, 数值为 189 μg/L。

标准曲线拟合的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_0) = \frac{u(c_0)}{\bar{c}} = 0.00810 \quad (15)$$

3.2.5 试样测量重复性引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\bar{X})$

对 100 μg/kg 浓度添加的试样进行 10 次平行测定, 所得结果见表 4。

经计算, 10 次平行测定结果的平均值为:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = 91.4 \text{ μg/kg}$$

根据贝塞尔公式, 单个测定值的标准偏差为:

$$S_{(X)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 1.6623 \text{ μg/kg}$$

试样测定平均值的 A 类标准不确定度为:

$$u(\bar{x}) = \frac{S_{(x)}}{\sqrt{n}} = 0.5257 \text{ μg/kg}$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\bar{X}) = \frac{u(\bar{X})}{\bar{X}} = 0.005752$$

同时, 对平均回收率进行显著性检验^[15,16], 以确定回收率校准因子是否在计算公式中采用, 显著性检验采用 t 检验, 当检验值 t 大于或等于临界值 $t(95,10)=2.23$ ^[15,16]时, 则 R 于 100%有显著性差异, 说明校准因子必须在计算公式中采用, 用于修正结果, 否则不采用。

$$t = \frac{100\% - \bar{R}}{u(\bar{R})} = \frac{1 - 0.914}{0.5257} = 0.16$$

本实验 t 值为 0.16, 小于临界值 2.23, 说明平均回收率与 100%无差异显著, 在计算公式中可忽略校准因子。

综上, 试样测量重复性引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\bar{X}) = 0.00575 \quad (16)$$

3.2.6 仪器引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\bar{Q})$

对浓度为 500 μg/L 标准溶液进行 6 次重复测定, 所得峰面积见表 5。

表 5 重复进样测量结果
Table 5 Data of repeat determination in sample

测定次数	1	2	3	4	5	6
峰面积 (mAU*min)	0.2342	0.2353	0.235	0.2344	0.2344	0.2345

经计算, 6 次重复进样所测得峰面积的平均值为:

$$\bar{Q} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Q_i = 0.2346 \text{ mAU*min}$$

根据贝塞尔公式, 单个峰面积的标准偏差为:

$$S_{(Q)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Q_i - \bar{Q})^2}{n-1}} = 0.0004243 \text{ mAU*min}$$

峰面积平均值的 A 类标准不确定度为:

$$u(\bar{Q}) = \frac{S_{(Q)}}{\sqrt{n}} = 0.0001732 \text{ mAU*min}$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\bar{Q}) = \frac{u(\bar{Q})}{\bar{Q}} = 0.000738 \quad (17)$$

3.3 合成标准不确定度的评定

根据各分量相对标准不确定度的评定^[15,18], 依据式 (12)~(17), 归纳出不确定度的分量、来源及相对标准不确定度见表 6。

由表 6, 合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}(C)^2 + u_{\text{rel}}(m)^2 + u_{\text{rel}}(V)^2 + u_{\text{rel}}(C_0)^2 + u_{\text{rel}}(\bar{X})^2 + u_{\text{rel}}(\bar{Q})^2} = 0.012$$

表 6 相对标准不确定度总结
Table 6 Collection of standard uncertainty

不确定度的分量	来源	相对标准不 确定度	类型
$u_{\text{rel}}(C)$	标准溶液配制	0.00719	B
$u_{\text{rel}}(m)$	试样称量	0.0000576	B
$u_{\text{rel}}(V)$	试样定容	0.0002	B
$u_{\text{rel}}(C_0)$	标准曲线拟合	0.00810	A
$u_{\text{rel}}(\bar{X})$	试样测量重复性	0.00575	A
$u_{\text{rel}}(\bar{Q})$	仪器进样重复性	0.000738	A

试样中甲砒霉素含量的合成标准不确定度为:

$$u(X) = X \cdot u_{\text{rel}}(X) = 91.4 \times 0.012 = 1.1 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

通过对高效液相色谱法检测牛奶中甲砒霉素残留量不确定度各分量的评定, 由表 6 的数据可以看出: 标准溶液浓度、标准曲线拟合以及试样测量重复性对检测结果影响较大, 其次为仪器进样重复性和试样定容, 试样称量引入的不确定度极小, 可以忽略不计。

3.4 扩展不确定度的评定

扩展不确定度由合成标准不确定度乘以包含因子得到, 取置信水平 95%, 则 $k=2$, 牛奶中甲砒霉素残留量的扩展不确定度为:

$$U(X) = k \cdot u(X) = 2.2 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

用高效液相色谱法测定牛奶中甲砒霉素残留量, 当取样量为 5.00 g, $k=2$ (置信水平 95%)时, 测得牛奶中甲砒霉素残留量为 $(91.4 \pm 2.2) \text{ } \mu\text{g/kg}$ 。

4 结 论

通过使用高效液相色谱法对牛奶中甲砒霉素残留量不确定度各分量的测定, 从最终数据分析, 影响检测结果的三大因素由大到小依次为标准曲线拟合(A 类评定)、标准溶液配制(B 类评定)以及试样测量重复性(A 类评定); 其次是试样定容体积(B 类评定)和仪器进样重复性(A 类评定), 试样称量(B 类评定)引入的不确定度极小, 可以忽略不计。

从评定类型分析, 六大分量中 B 类评定所占不确定度比 A 类评定小, B 类评定不确定度主要来源于校准证书、厂家说明书、第三方权威机构发布的量值等客观因素, A 类评定不确定度主要来源于多次测量所得量值等主观操作^[21]。

综上所述, 标准曲线的配制、拟合以及试样前处理操作是实际检测过程中提高检测数据准确性的关键因素, 可通过使用更高纯度的对照品、更接近量器校准温度的实验

环境以及使用更精确的移液量器来减小标准曲线配制过程中产生的不确定度; 可通过增加标准曲线各浓度点的测定次数以及依据样品实际浓度调整标准曲线各点浓度的大小来减小标准曲线拟合产生的不确定度; 可通过规范整体实验操作、严格遵守实验方法、增加测定次数、保证仪器在最佳状态下运行以及使用检定合格的计量器具, 来尽量减小或避免试样前处理对检测结果的干扰, 以保证检验结果的准确性。

参考文献

[1] 周庆民, 薄俊平, 冯万宇, 等. 抗生素在奶牛临床上的使用现状[J]. 中国乳业, 2009, (6): 56-59.
Zhou QM, Bo JP, Feng WY, *et al*. Status of antibiotics in clinical use of dairy cows [J]. Chin Dair, 2009, (6): 56-59.

[2] 黄正才, 吴绍容. 甲砒霉素对牛细菌性呼吸器病的效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1999, (11): 24-26.
Huang ZC, Wu SR. Effect of thiamphenicol on bovine bacterial respiratory disease [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 1999, (11): 24-26.

[3] 黄正才, 彭兰君. 甲砒霉素对牛细菌性呼吸道病的疗效研究[J]. 山东畜牧兽医, 1998, (6): 4-5.
Huang ZC, Peng LJ. Effects of thiamphenicol on bovine bacterial respiratory diseases [J]. Shandong Anim Sci Vet Med, 1998, (6): 4-5.

[4] 何俊莎, 毛以智, 王兴群. 甲砒霉素的抗菌作用和毒、副作用[J]. 养殖与饲料, 2010, (4): 47-49.
He JS, Mao YZ, Wang XQ. Antibacterial effect, toxicity and side effects of thiamphenicol [J]. Cult Feed, 2010, (4): 47-49.

[5] 李兆新, 潘明轩, 邢丽红, 等. 水生动物中甲砒霉素的药理学作用及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1212-1219.
Li ZX, Pan MX, Xing LH, *et al*, Research progress in pharmacological effects and detection techniques of thiamphenicol in aquatic organisms [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(4): 1212-1219.

[6] 黄陆军, 李晓春. 甲砒霉素致乳糜血尿 1 例[J]. 中华现代皮肤科学杂志, 2005, 2(1): 87-88.
Huang LJ, Li XC. Case of chyluria caused by thiamphenicol [J]. Chin J Mod Dermatol, 2005, 2(1): 87-88.

[7] 周学军, 韩德兰, 冯月皎. 甲砒霉素致变态反应一例[J]. 山西医药杂志, 2012, (11): 1143-1144.
Zhou XJ, Han DL, Feng YJ. A case of allergic reaction induced by thiamphenicol [J]. Shanxi Med J, 2012, (11): 1143-1144.

[8] 任汝静, 王刚, 汤荟冬. 甲砒霉素致周围神经病[J]. 药物不良反应杂志, 2011, 13(5): 305-306.
Ren RJ, Wang G, Tang HD. Thiamphenicol-induced peripheral neuropathy [J]. Adv Drug Reac J, 2011, 13(5): 305-306.

[9] 吴红娅, 梅红武. 甲砒霉素致变态反应 1 例[J]. 医药导报, 2004, 23(4): 265.
Wu HY, Mei HW. A case of allergic reaction induced by thiamphenicol [J]. Herald Med, 2004, 23(4): 265.

[10] 张义静. 甲砒霉素的现状和走向[J]. 医药导报, 1991, (1): 37-38.
Zhang YJ. Current status and trend of thiamphenicol [J]. Herald Med,

- 1991, (1): 37–38.
- [11] Takino M, Daishima S, Nakahara T. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1011(1/2): 67–75.
- [12] Allen EH. Review of chromatographic methods for Moramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food-producing animals [J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1985, 68(5): 990–999.
- [13] Rønning HT, Einarsen K, Asp TN. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1118(2): 226–233.
- [14] GB 29689-2013 食品安全国家标准牛奶中甲砒霉素残留量的测定高效液相色谱法[S].
GB 29689-2013 National food safety standard determination-Thiamphenicol residues in milk high performance liquid chromatography [S].
- [15] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Measurement uncertainty evaluation and representation [S].
- [16] 付登洲, 杨雪娇, 黄伟. HPLC 法测定乳制品中三聚氰胺含量的不确定度评定[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(2): 108–111.
Fu DZ, Yang XJ, Huang W. Evaluation of uncertainty in determination of melamine content in dairy products by HPLC [J]. *Food Res Dev*, 2011, 32(2): 108–111.
- [17] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 General glass spectrometer verification regulations [S].
- [18] CNAS-GL 06: 2006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 06:2006 Guidelines for the evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].
- [19] 物竞数据库 乙腈[EB/OL]. <http://www.basechem.org/chemical/474>
Competitive database-Acetonitrile [EB/OL]. <http://www.basechem.org/chemical/474>
- [20] 物竞数据库. 物竞数据库 水 [EB/OL]. <http://www.basechem.org/chemical/12690>
Competitive database-Water [EB/OL]. <http://www.basechem.org/chemical/12690>
- [21] 林华, 许蓉蓉, 闭秋华, 等. 高效液相色谱法测定鱼油软胶囊中维生素 D₃ 含量的不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(12): 3177–3182
Lin H, Xu RR, Bi QH, *et al.* evaluation of uncertainty in determination of vitamin D₃ in fish oil soft capsules by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(12): 3177–3182

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



孙 婧, 主要研究方向为食品安全检测与控制。

E-mail: liuxiaohai@mengniu.cn



刘晓海, 助理工程师, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测与控制。

E-mail: liuxiaohai@mengniu.cn