

高效液相色谱-串联质谱法测定菠菜中 5 种磺胺 抗生素残留的不确定度评定

薛伟锋*, 陈 溪, 马玉良, 刘梦遥, 褚莹倩, 刘水琳, 候辰侠

(大连出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 大连 116600)

摘 要: 目的 评定高效液相色谱-串联质谱法测定菠菜中 5 种磺胺类抗生素含量的不确定度。**方法** 通过建立数学模型, 对高效液相色谱-串联质谱法测定菠菜中 5 种磺胺类抗生素含量进行不确定度评定, 分析不确定度来源及其对测定过程中不确定度的相对贡献, 并计算合成不确定度, 最终得到菠菜中 5 种磺胺类抗生素的扩展不确定度。**结果** 当菠菜中 5 种磺胺含量为 3.6~3.7 $\mu\text{g/kg}$ 时, 在 95%置信区间下, 合成不确定度为 0.302~0.443 $\mu\text{g/kg}$, 扩展不确定度为 0.7~0.9 $\mu\text{g/kg}$ ($k=2$)。**结论** 实验过程的不确定度主要来源于标准溶液配制、质谱仪电喷雾电离源和测量重复性。

关键词: 磺胺抗生素; 菠菜; 高效液相色谱-串联质谱法; 不确定度

Uncertainty evaluation of determination of 5 kinds of sulfonamides residues in spinach by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XUE Wei-Feng*, CHEN Xi, MA Yu-Liang, LIU Meng-Yao, CHU Ying-Qian,
LIU Shui-Lin, HOU Chen-Xia

(Inspection and Quarantine Technical Center of Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,
Dalian 116600, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of 5 kinds of sulfonamides contents in spinach by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** By establishing a mathematical model, the uncertainty of the determination of 5 kinds of sulfonamides contents in spinach was evaluated. The sources of uncertainty and their relative contribution to the uncertainty in the determination process were analyzed, and the synthetic uncertainty was calculated. Finally, the extension uncertainty of 5 kinds of sulfonamides in spinach was obtained. **Results** When 5 sulfonamides content was 3.6~3.7 $\mu\text{g/kg}$, the synthetic uncertainties were 0.302~0.443 $\mu\text{g/kg}$ and the extended uncertainties were 0.7~0.9 $\mu\text{g/kg}$ ($k=2$) under the 95% confidence interval. **Conclusion** The evaluation results show that the uncertainties of the experiments are mainly derived from standard solution preparation, electrospray ion source of HPLC-MS/MS and measurement repeatability.

KEY WORDS: sulfonamide antibiotic; spinach; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; uncertainty

基金项目: 国家自然科学基金项目(21777014)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21777014)

*通讯作者: 薛伟锋, 工程师, 主要研究方向为有机污染物分析检测。E-mail: xwf526@163.com

*Corresponding author: XUE Wei-Feng, Engineer, Inspection and Quarantine Technical Center of Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116600, China. E-mail: xwf526@163.com

1 引言

磺胺类药物是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 常被用于预防和治疗细菌性疾病。该类药物结构稳定, 在环境中能够长期存在, 给人类健康造成严重威胁^[1]。近年来, 磺胺类抗生素普遍用于养殖业, 使用后这些药物大多以其原形或者代谢物形式被排出体外, 畜禽粪便广泛被用作肥料而进入到农田, 进而影响农田土壤和灌溉水。相比于关注度较高的动物性食品中磺胺污染问题, 植物性食品中该类化合物的污染关注较少。植物性食品中磺胺污染可能会产生与动物性食品中残留超标和农药残留超标一样的人体健康风险。因此, 有必要开展植物性食品中磺胺检测分析研究。

目前, 关于磺胺类抗生素在动物类食品和环境中的检测分析较多, 检测方法涉及高效液相色谱法^[2-5]、气相色谱质谱联用分析法^[6]、液相色谱质谱联用分析法^[7-17], 但对于蔬菜中磺胺类药物残留检测分析却相对较少, 高效液相色谱-串联质谱法是其中一种重要分析手段^[18-20]。

本研究建立了基于高效液相色谱-串联质谱法同时测定菠菜中 5 种磺胺的残留量的分析方法。该方法快速、简单、实用性高, 能够满足日常蔬菜中磺胺残留检测的要求。测量不确定度既能合理地赋予被测量之值的分散性^[21-23], 又能表现出测定结果的可信度^[24]。本文根据 JJF 1059-2012《测量不确定度评定与表示》^[25], 为菠菜中磺胺类药物的不确定度评定提供参考模型, 以期能够确定检测过程中引入不确定度的主要原因, 以便采取改进措施, 从而提高测量结果的准确性, 为正确评价和使用检测数据提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Qtrap 5500 型(ESI⁺)液相色谱质谱联用仪(美国 AB 公司); Sigma 3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); IKA MS3 digital 涡旋混合器(德国 IKA 公司)。

乙腈和甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲酸(色谱纯, 纯度 ≥ 99%, 上海麦克林公司); 乙酸(优级纯, 纯度 99.9%, 天津科密欧公司); 实验用水为超纯水, 电阻率为 18.25 MΩ·cm(25 °C)。

选取的 5 种磺胺类抗生素的混合标准溶液包括磺胺嘧啶(99.0%, CAS 号: 68-35-9)、磺胺二甲基嘧啶(99.0%, CAS 号: 57-68-1)、磺胺甲基嘧啶(99.0%, CAS 号: 127-79-7)、磺胺氯哒嗪(99.9%, CAS 号: 80-32-0)和磺胺甲基异噁唑(98.0%, CAS 号: 723-46-6) [浓度标准值均为 100 μg/mL (1 mL), First Standard 公司]。

2.2 实验方法

2.2.1 标准工作曲线的绘制

从 100 μg/mL 23 种磺胺混标溶液中取出 100 μL 加入

到液相小瓶中, 然后加入 900 μL 甲醇, 此时溶液浓度为 10 μg/mL。从 10 μg/mL 中取出 100 μL 加入到 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 此时溶液浓度为 0.1 μg/mL。从上述 0.1 μg/mL 溶液中依次取出 0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0 mL 加入到 10 mL 容量瓶中, 用菠菜基质溶液定容到 10 mL, 配制成质量浓度为 1、2、5、10 和 20 μg/L 的系列标准工作溶液, 以标准溶液的质量浓度(C)为横坐标, 色谱峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

2.2.2 样品前处理

称取 5.00 g 已均质过的菠菜试样于 50 mL 的离心管中, 加入 1%乙酸乙腈 20 mL, 用涡旋混合器混匀 30 s 后, 震荡提取 30 min。将离心后样品用滤纸过滤, 然后过 0.2 μm 微孔滤膜, 最后按仪器工作条件进行测定。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

美国 Waters 公司 XBridge C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL; 流动相: A 为 1% 甲酸/水溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Mobile phase gradient elution procedure

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.4	95	5
2.00	0.4	95	5
5.00	0.4	65	35
8.00	0.4	45	55
8.10	0.4	10	90
9.00	0.4	10	90
9.10	0.4	95	5
12.00	0.4	95	5

(2) 质谱条件

动态多反应监测(dynamic multi reaction monitoring, DMRM)正离子扫描模式。其他质谱参数见表 2。

2.2.4 数学模型和各分量不确定度的来源

(1) 数学模型

菠菜样品中磺胺浓度计算公式:

$$X = \frac{C \times V \times f_r}{m \times R} \tag{1}$$

式中: X-菠菜中被测组分含量, μg/kg; C-从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度, μg/L; V-试样溶液定容体积, mL; f_r-测量重复性; m-试样溶液所代表试样的质量, g; R-回收率, %。

(2) 各分量不确定度的来源

根据测量过程和公式(1), 菠菜中磺胺含量测量不确定度的来源如下:

- ①标准溶液配制引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$;
- ②定容体积不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$;
- ③测量重复性不确定度 $u_{\text{rel}}(f\bar{r})$;
- ④回收率不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$;
- ⑤仪器电喷雾电离源测量结果的不确定度 $u_{\text{rel}}(S)$ 。

表 2 多反应监测扫描模式的部分质谱参数
Table 2 Some mass spectrum parameters of multi reaction monitoring scanning mode

名称	定性离子 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞电压 /V	去簇电压 /V
磺胺嘧啶	251/156	251/156	23	55
	251/185		27	50
磺胺二甲基嘧啶	279/156	279/156	22	55
	279/204		20	60
磺胺甲基嘧啶	265/156	265/156	25	50
	265/172		24	60
磺胺氯哒嗪	285/156	285/156	23	50
	285/108		35	50
磺胺甲基异噁唑	254/156	254/156	23	50
	254/147		22	45

3 结果与分析

3.1 测量不确定度评定

3.1.1 标准溶液配制引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$

3.1.1.1 标准溶液浓度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{st}})$

(1) 磺胺标准物质溶液引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(p)$

由标准物质证书提供的磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯哒嗪和磺胺甲基异噁唑纯度分别为 99.0%、99.0%、99.0%、99.9%和 98.0%，扩展不确定度均为 5%，包含因子(*k*)均为 2，则标准不确定度均为 $u(p)=5\%/2=0.025$ ；相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(p)$ 按照公式“ $u(p)/$ 纯度”计算获得，结果列于表 3 中。

表 3 5 种磺胺标准物质溶液引入的不确定度
Table 3 Uncertainty of introduction of five sulfonamides standard solution

	磺胺嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺氯哒嗪	磺胺甲基异噁唑
$u_{\text{rel}}(p)$	0.0253	0.0253	0.0253	0.0250	0.0255

(2) 标准溶液配制过程引入不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{st}})$

从 100 μg/mL 磺胺混标溶液中取出 100 μL 加入到液相小瓶中，然后加入 900 μL 甲醇，此时溶液浓度为 10 μg/mL。从 10 μg/mL 中取出 100 μL 加入到 10 mL 容量

瓶中，用甲醇定容，此时溶液浓度为 0.1 μg/mL。

①实验室温度在(20±5) °C 范围内变化，甲醇的膨胀系数为 $1.18\times10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ ，则甲醇随温度产生体积变化为：

$\pm(5\times1.18\times10^{-3}V_2)=\pm0.0059V_2$ (其中， V_2 为甲醇体积)按照矩形分布，温度变化产生的不确定度为；

$$u(V_{\text{甲醇}})=0.0059V_2/\sqrt{3}=0.0034V_2$$

液相小瓶中甲醇随温度变化导致体积变化引入的不确定度为 $u'(V_{1.0})=0.0034V_2=0.0034\text{ mL}$ ，相对标准不确定 $u_{\text{rel}}'(V_{1.0})=0.0034$ 。

10 mL 容量瓶中甲醇随温度变化导致体积变化引入的不确定度为 $u'(V_{10.0})=0.0034V_2=0.034\text{ mL}$ ，相对标准不确定 $u_{\text{rel}}'(V_{10.0})=0.0034$ ；

200 μL 移液器中 100 μL 甲醇随温度变化导致体积变化引入的不确定度为 $u'(V_{0.1})=0.0034V_2=0.00034\text{ mL}$ ，相对标准不确定 $u_{\text{rel}}'(V_{0.1})=0.0034$ ，由于使用了 2 次，所以相对标准不确定 $u_{\text{rel}}''(V_{0.1})=\sqrt{2}u_{\text{rel}}'(V_{0.1})=0.004808$ ；

1 mL 移液器中 900 μL 甲醇随温度变化导致体积变化引入的不确定度为 $u'(V_{0.9})=0.0034V_2=0.00306\text{ mL}$ ，相对标准不确定 $u_{\text{rel}}'(V_{0.9})=0.0034$ 。

②标准曲线配制过程引入不确定度。从上述 0.1 μg/mL 溶液中依次取出 0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0 mL 加入到 10 mL 容量瓶中，用菠菜基质溶液定容到 10 mL，此时标曲浓度为 1、2、5、10 和 20 μg/L。由容量瓶和移液器配制各级标准溶液引入的体积相对标准不确定度如表 4~6^[26,27]所示，其中， $u(V_{\text{容量瓶}})=10\text{ mL}$ 容量瓶最大允许误差/ $\sqrt{3}$ ； $u(V_{\text{甲醇}})=$ 甲醇随温度产生体积变化/ $\sqrt{3}$ ； $u(V_{\text{容量瓶}+\text{甲醇}})=\sqrt{u^2(V_{\text{容量瓶}})+u^2(V_{\text{甲醇}})}$ ； $u_{\text{rel}}(V_{\text{容量瓶}+\text{甲醇}})=u(V_{\text{容量瓶}+\text{甲醇}})/$ 定容体积。同理， $u(V_{\text{移液器}})$ 、 $u(V_{\text{甲醇}})$ 、 $u(V_{\text{移液器}+\text{甲醇}})$ 和 $u_{\text{rel}}(V_{\text{移液器}+\text{甲醇}})$ 计算方法同上。

表 4 计量器具校准信息
Table 4 Calibration information of measuring instruments

计量器具	体积/mL	使用次数	最大允许误差
10 mL A 级容量瓶	10	5	±0.02 mL
200 μL 移液器	0.1	1	±2%
200 μL 移液器	0.2	1	±1.5%
1 mL 移液器	0.5	1	±1%
1 mL 移液器	1	1	±1%
5 mL 移液器	2	1	±0.5%

表 5 容量瓶引入的不确定度*
Table 5 Uncertainty of volumetric introduction*

$V_{\text{容量瓶}}/\text{mL}$	$U_{(V_{\text{容量瓶}})/\text{mL}}$	$U_{(V_{\text{甲醇}})/\text{mL}}$	$U_{(V_{\text{容量瓶+甲醇}})/\text{mL}}$	$u_{\text{rel}}(V_{\text{容量瓶+甲醇}})$
10	0.0115	0.034	0.0359	0.00359

注: *满足矩形分布, 已考虑甲醇随温度变化导致体积变化引入的不确定度。

标准溶液配制过程引入的相对标准不确定度

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{st}})=\sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_{1.0})+u_{\text{rel}}^2(V_{10.0})+u_{\text{rel}}^2(V_{0.1})+u_{\text{rel}}^2(V_{0.9})+5u_{\text{rel}}^2(V_{10.0})+u_{\text{rel}}^2(V_{2.0})+u_{\text{rel}}^2(V_{1.0})+u_{\text{rel}}^2(V_{0.5})+u_{\text{rel}}^2(V_{0.2})+u_{\text{rel}}^2(V_{0.1})}$$

表 6 移液器引入的不确定度*
Table 6 Uncertainty of pipette introduction*

$V_{\text{移液器}}/\text{mL}$	$V_{\text{移液器}}$ 最大允许误差/%	$u(V_{\text{移液器}})/\text{mL}$	$u(V_{\text{甲醇}})/\text{mL}$	$u(V_{\text{移液器+甲醇}})/\text{mL}$	$u_{\text{rel}}(V_{\text{移液器+甲醇}})$
2.0	0.5	0.00577	0.00680	0.00892	0.00446
1.0	1	0.00577	0.00340	0.00670	0.00670
0.5	1	0.00289	0.00170	0.00335	0.00670
0.2	1.5	0.00173	0.00068	0.00186	0.00930
0.1	2	0.00116	0.00034	0.00120	0.01204

注: *满足矩形分布, 已考虑甲醇随温度变化导致体积变化引入的不确定度。

表 7 5 种磺胺的标准溶液浓度引入的不确定度
Table 7 Uncertainty of concentration introduction of 5 sulfonamides standard solutions

	磺胺嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺氯哒嗪	磺胺甲基异噁唑
$u_{\text{rel}}(C_{\text{st}})$	0.0332	0.0332	0.0332	0.0330	0.0334

表 8 5 种磺胺标准工作溶液浓度、峰面积、校准曲线、相关系数和回归曲线的剩余残差
Table 8 Residual error of concentration, peak area, calibration curve, correlation coefficient and regression curve of 5 sulfonamide standard working solutions

化合物	溶液浓度/($\mu\text{g/L}$)	峰面积	校准曲线方程	相关系数	回归曲线的剩余残差
磺胺嘧啶	1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0	83400, 184600, 440000, 890000, 1812000	$Y=90700C-6000$	0.999	8360.32
磺胺二甲基嘧啶	1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0	72200, 116600, 245000, 458000, 894000	$Y=42800C+29300$	0.996	4526.86
磺胺甲基嘧啶	1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0	62200, 116600, 258000, 498000, 984000	$Y=48200C+16700$	0.999	2784.33
磺胺氯哒嗪	1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0	72400, 144600, 350000, 695000, 1380000	$Y=69300C+3250$	0.999	4867.56
磺胺甲基异噁唑	1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0	93400, 176600, 425000, 823000, 1675000	$Y=83200C+10400$	0.999	9730.88

$$= \sqrt{(0.0034)^2 + (0.0034)^2 + (0.004808)^2 + (0.0034)^2 + 5 \times (0.00359)^2 + (0.00446)^2 + (0.0067)^2 + (0.0067)^2 + (0.009304)^2 + (0.012037)^2}$$
$$=0.0215$$

5 种磺胺的 $u_{\text{rel}}(C_{\text{st}})$ 按照 $\sqrt{u_{\text{rel}}^2(p)+u_{\text{rel}}^2(V_{\text{st}})}$ 计算获得, 结果列于表 7 中。

3.1.1.2 标准曲线拟合不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{curve})$

对标准工作溶液进行测定, 经线性拟合得到校准曲线。标准工作溶液浓度、峰面积、校准曲线方程和相关系数见表 8, 其中 C 为被测标准溶液浓度, Y 为峰面积。

对每种磺胺样品溶液进行 6 次测量, 获得样品溶液的质量浓度和质量浓度平均值。根据前处理过程中称取的菠菜样品 5.00 g 以及定容体积 20 mL, 计算获得 5 种磺胺对应浓度平均值分别为 3.6、3.7、3.6、3.6 和 3.7 $\mu\text{g/kg}$ 。根据式(2)计算获得拟合曲线引入的标准不确定度 $u(\text{curve})$ 和相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{curve})$, 结果见表 9。

$$u(\text{curve}) = \frac{S_R}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{C} - \bar{C}_0)^2}{\sum_{j=1}^n (C_{\text{stj}} - \bar{C}_0)^2}} \quad (2)$$

其中;

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (y_j - y_0)^2}{n-1}} \quad \bar{C}_0 = \frac{\sum_{j=1}^n C_{\text{stj}}}{n}$$

式中; S_R —回归曲线的剩余残差(残差的标准差); a —直线斜率; p —待测样品重复测定次数 $p=6$; n —回归曲线的点数, $n=5$; y_j —各标准溶液峰面积; y_0 —各标准溶液浓度带入回归方程的峰面积; C_{stj} —各标准溶液浓度值, $\mu\text{g/L}$; $\bar{C}_0$ —标准溶液浓度的平均值, $\mu\text{g/L}$; $\bar{C}$ —待测样品溶液浓度均值, $\mu\text{g/L}$ 。综上, 标准溶液配制引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$ 根据公式 $u_{\text{rel}}(C) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(C_{\text{st}}) + u_{\text{rel}}^2(\text{curve})}$ 计算获得, 结果见表 10。

3.1.2 定容体积不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$

量取 2 个 10 mL 1%乙酸乙腈溶液, 均定容于 10 mL 容量瓶中, 用于菠菜中 5 种磺胺的前处理实验。10 mL 单标线 A 级容量瓶的容量允差为 ± 0.020 mL, 取矩形分布, 则标准不确定度和相对标准不确定度分别为; $u(V) = 0.02 / \sqrt{3} = 0.0115$ mL; $u_{\text{rel}}(V) = u(V) / V = 0.00115$, 由于 10 mL 容量瓶使用了 2 次, 所以相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}'(V) = \sqrt{2} u_{\text{rel}}(V) = 0.00163$ 。

3.1.3 测量重复性不确定度 $u_{\text{rel}}(f_i)$

在重复性条件下, 对同一样本从取样开始重复测量 6 次, 计算标准不确定度和相对标准不确定度, 测定结果见表 11。

3.1.4 回收率不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$

相同操作条件下, 对菠菜样品进行了加标回收实验。测定的回收率、平均回收率以及回收率标准不确定度和相对标准不确定度见表 12。

表 9 样品溶液 6 次测量的质量浓度、质量浓度平均值、标准不确定度和相对标准不确定度

Table 9 Mass concentration, mean value of mass concentration, standard uncertainty and relative standard uncertainty of sample solution measured six times

化合物	$C/(\mu\text{g/L})$	$f/(\mu\text{g/L})$	$u(\text{curve})/(\mu\text{g/L})$	$u_{\text{rel}}(\text{curve})$
磺胺嘧啶	0.819, 0.856, 0.919, 1.040, 0.866, 0.889	0.8982	0.0685	0.0763
磺胺二甲基嘧啶	0.865, 0.877, 0.823, 1.020, 1.066, 0.881	0.9220	0.0785	0.0852
磺胺甲基嘧啶	0.855, 0.912, 0.899, 0.919, 0.966, 0.876	0.9045	0.0429	0.0475
磺胺氯哒嗪	0.854, 0.877, 0.899, 0.987, 0.866, 0.981	0.9107	0.0522	0.0573
磺胺甲基异噁唑	0.908, 0.898, 0.875, 0.999, 1.002, 0.877	0.9265	0.0868	0.0937

表 10 5 种磺胺标准溶液配制引入的不确定度

Table 10 Uncertainty in preparation and introduction of 5 sulfonamide standard solutions

	磺胺嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺氯哒嗪	磺胺甲基异噁唑
$u_{\text{rel}}(C)$	0.0832	0.0914	0.0580	0.0661	0.0995

表 11 测量重复性引入的不确定度

Table 11 Uncertainty introduced by measurement repeatability

化合物	$C/(\mu\text{g/L})$	$\bar{C}/(\mu\text{g/L})$	$S(C)/(\mu\text{g/L})$	$u(f_i)/(\mu\text{g/L})$	$u_{\text{rel}}(f_i)$
磺胺嘧啶	0.819, 0.856, 0.919, 1.040, 0.866, 0.889	0.898	0.077091	0.0315	0.0350
磺胺二甲基嘧啶	0.865, 0.877, 0.823, 1.020, 1.066, 0.881	0.922	0.097053	0.0396	0.0430
磺胺甲基嘧啶	0.855, 0.912, 0.899, 0.919, 0.966, 0.876	0.905	0.038318	0.0156	0.0173
磺胺氯哒嗪	0.854, 0.877, 0.899, 0.987, 0.866, 0.981	0.911	0.058736	0.0240	0.0263
磺胺甲基异噁唑	0.908, 0.898, 0.875, 0.999, 1.002, 0.877	0.927	0.058675	0.0240	0.0259

表 12 回收率引入的不确定度
Table 12 Uncertainty of recovery rate introduction

化合物	<i>R</i> /%	<i>r</i> /%	<i>S</i> (<i>R</i>)/%	<i>u</i> (<i>R</i>)/%	<i>u_{rel}</i> (<i>R</i>)
磺胺嘧啶	81.9, 85.6, 91.9, 104.0, 86.6, 88.9	89.8	0.077091	0.0315	0.0350
磺胺二甲基嘧啶	86.5, 87.7, 82.3, 102.0, 106.6, 88.1	92.2	0.097053	0.0396	0.0430
磺胺甲基嘧啶	85.5, 91.2, 89.9, 91.9, 96.6, 87.6	90.5	0.038318	0.0156	0.0173
磺胺氯哒嗪	85.4, 87.7, 89.9, 98.7, 86.6, 98.1	91.1	0.058736	0.0240	0.0263
磺胺甲基异噁唑	90.8, 89.8, 87.5, 99.9, 100.2, 87.7	92.7	0.058675	0.0240	0.0259

此处, 用 *t* 检验来判断平均回收率是否与 1.0 有显著性差异。设显著水平为 $\alpha=0.05$, $t_{0.025}(5)=2.571$, 若 *t* 大于或等于 $t_{0.025}(5)$ 值, 则平均回收率与 1.0 有显著差异, 应考虑平均回收率不确定度; 反之, 不考虑。*t* 值按公式 $t=|1-1/u(R)|$ 计算, 结果列于表 13 中。从表 13 中可知, 除磺胺二甲基嘧啶的 *t* 值小于 2.571, 不需要考虑回收率引入的不确定度外, 其余 4 种磺胺均需要考虑回收率引入的不确定度。

表 13 5 种磺胺 *t* 值
Table 13 *T* value of 5 sulfonamides

	磺胺嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺氯哒嗪	磺胺甲基异噁唑
<i>t</i>	3.236	1.969	6.105	3.726	3.068

3.1.5 电喷雾电离源测量结果的不确定度 $u_{rel}(S)$
由仪器校准证书提供的电离源测量结果的相对扩展不确定度为 11%, 包含因子 $k=2$, 则相对标准不确定度 $u_{rel}(S)=0.11/2=0.055$ 。

3.2 扩展不确定度及结果表述

3.2.1 合成相对标准不确定度和合成标准不确定度
液相色谱-串联质谱法测定菠菜中 5 种磺胺浓度合成相对标准不确定度 u_{rel} 和合成标准不确定度 *u* 分别按照 $u_{rel}=\sqrt{u_{rel}^2(C)+u_{rel}^2(V)+u_{rel}^2(fr)+u_{rel}^2(R)+u_{rel}^2(S)}$ 和 $u=u_{rel} \times C$ 进行计算, 结果如表 14 所示。

表 14 5 种磺胺浓度合成相对标准不确定度和合成标准不确定度
Table 14 Relative standard uncertainty and synthetic standard uncertainty of 5 sulfonamide concentrations

	磺胺嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺氯哒嗪	磺胺甲基异噁唑
u_{rel}	0.111	0.115	0.0836	0.0937	0.119
<i>u</i> /(μg/kg)	0.400	0.424	0.302	0.341	0.443

根据欧盟的 Commission Regulation (EC) No 333/2007 报告(C.3.3.2)^[28], 基于适用性原则, 结合方法的检出限以

及该检测项目的限量要求, 在限量水平上, 5 种磺胺检测结果的标准不确定度最大值根据公式(3)计算均为 1.0 μg/kg, 满足要求。

$$u=\sqrt{(\frac{LOD}{2})^2+(aC)^2}$$
 (3)

式中; *u*—最大标准不确定度, μg/kg; LOD—方法检出限 (limit of detection), μg/kg; α —不同被测组分含量对应的系数, 见表 15; *C*—所关注的含量水平, μg/kg。

根据上述计算, 不确定度分量分布情况见表 16。

表 15 不同被测组分含量对应的 α 值
Table 15 α value corresponding to the content of different tested components

被测组分含量 <i>C</i> /(μg/kg)	α
≤50	0.2
51~500	0.18
501~1000	0.15
1001~10000	0.12
>10000	0.1

表 16 不确定度分量相对贡献
Table 16 Relative contribution of uncertainty components

化合物	标准溶液配制/%	试样定容体积/%	测量重复性/%	回收率/%	电离源测量结果/%
磺胺嘧啶	39.64	0.78	16.69	16.69	26.20
磺胺二甲基嘧啶	47.86	0.85	22.50	0.00	28.79
磺胺甲基嘧啶	38.85	1.09	11.59	11.59	36.87
磺胺氯哒嗪	37.69	0.93	15.01	15.01	31.36
磺胺甲基异噁唑	47.86	0.78	12.44	12.44	26.47

3.2.2 扩展不确定度
当置信区间为 95%时, 包含因子取 $k=2$, 则扩展不确

定度按照公式 $u_k=u*k$ 计算可得, 结果列于表 17 中。不确定度的数字可采用通用的修约规则, 必要时可将后面的数字舍去, 末位进 1。因此, 5 种磺胺扩展不确定度可写为 0.9、0.9、0.7、0.7 和 0.9 $\mu\text{g/kg}$ ($k=2$)。

表 17 5 种磺胺扩展不确定度
Table 17 Uncertainty of 5 sulfonamides expansion

	磺胺 嘧啶	磺胺二甲基 嘧啶	磺胺甲基 嘧啶	磺胺氯 吡嗪	磺胺甲基 异噁唑
$u_k/(\mu\text{g/kg})$	0.800	0.849	0.605	0.683	0.885

用液相色谱-串联质谱法测定菠菜中 5 种磺胺类抗生素, 结果表示为:

- 磺胺嘧啶; $X=(3.6\pm0.9) \mu\text{g/kg}$, $k=2$;
- 磺胺二甲基嘧啶; $X=(3.7\pm0.9) \mu\text{g/kg}$, $k=2$;
- 磺胺甲基嘧啶; $X=(3.6\pm0.7) \mu\text{g/kg}$, $k=2$;
- 磺胺氯吡嗪; $X=(3.6\pm0.7) \mu\text{g/kg}$, $k=2$;
- 磺胺甲基异噁唑; $X=(3.7\pm0.9) \mu\text{g/kg}$, $k=2$ 。

4 结 论

本研究评定了高效液相色谱-串联质谱法测定菠菜中 5 种磺胺抗生素含量的不确定度, 对于采用标准曲线法测定菠菜中磺胺抗生素的含量, 试样定容体积引入的不确定度相对贡献最小(0.78%~1.09%), 可忽略不计; 标准溶液配制引入的不确定度相对贡献最大(37.69%~47.86%)。试样浓度主要由标准溶液配制影响, 因此, 在检测过程中, 一定要严格配制标准溶液。质谱仪电喷雾电离源测量结果引入的不确定度相对贡献(26.20%~36.87%)要大于测量重复性和回收率引入的不确定度相对贡献。除磺胺二甲基嘧啶不必考虑其回收率引入的不确定度外, 其余 4 种磺胺测量重复性和回收率引入的不确定度接近。在以后的检测过程中, 一定要注意操作的规范性、定期检定仪器、慎重选用量器、增加平行样检测以及保证回收率。

参考文献

[1] 赵双阳. 活性炭改性及吸附水中磺胺类抗生素的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
Zhao SY. Study on the modification and adsorption of sulfonamides in water by activated carbon [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013.

[2] 孙雷, 毕言锋, 李丹, 等. 猪肉中磺胺类药物残留检测能力验证分析[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(2): 23–26.
Sun L, Bi YF, Li D, *et al.* Study on the proficiency testing of sulfonamides residues determination in pig muscle [J]. Chin J Veter Drug, 2012, 46(2): 23–26.

[3] 杨晓松, 余辉菊, 邱莎, 等. 基质固相分散萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定动物性食品中磺胺类药物残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(5): 1109–1112.

Yang XS, Yu HJ, Qiu S, *et al.* Determination of eleven sulfonamides residues in animal foods by high performance liquid chromatography-fluorescence detection after matrix solid phase dispersion extraction [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(5): 1109–1112.

[4] 何丛薇, 王姣姣, 高文惠. 饲料及动物源性食品中磺胺类药物残留检测研究进展[J]. 饲料博览, 2007, 20(2): 39–43.
He CW, Wang JJ, Gao WH. Development of sulfonamide residue detection in feeds and edible animal products [J]. Feed Rev, 2007, 20(2): 39–43.

[5] Zhang J, Li WQ, Zhu WL, *et al.* Mesoporous graphitic carbon nitride as an efficient sorbent for extraction of sulfonamides prior to HPLC analysis [J]. Microchim Acta, 2019, 186(5).

[6] 赵晓凤, 杨中. 气相色谱-串联质谱法检测猪肉组织中的磺胺二甲嘧啶残留量[J]. 饲料工业, 2014, 35(3): 54–57.
Zhao XF, Yang Z. Analysis of sulfamethazinum in animal organizations by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Feed Ind, 2014, 35(3): 54–57.

[7] 陈坤才, 刘莉治, 彭荣飞, 等. 电喷雾超高效液质联用法测定动物性食品中磺胺类药物残[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(9): 2034–2036.
Chen KC, Liu LZ, Peng RF, *et al.* Determination of 11 kinds of sulfonamides in animal foods by ESI-UPLC-MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(9): 2034–2036.

[8] 杜玥, 杨慧元, 徐伟东. 液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 23 种磺胺及其增效剂残留[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 471–478.
Du Y, Yang HY, Xu WD. Liquid chromatography combined with tandem-mass spectrometry for multi residue determination of sulfonamides and the potentiator in meat [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(3): 471–478.

[9] 张海琪, 宋珊珊, 徐晓林, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定大黄鱼中 20 种磺胺类药物残留[J]. 分析化学, 2007, 36(2): 268–272.
Zhang HQ, Song LL, Xu XL, *et al.* Simultaneous determination of twenty sulfonamide residues in Yellow Larger Crocker by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2007, 36(2): 268–272.

[10] 庞国芳, 曹彦忠, 张进杰, 等. 液相色谱-串联质谱同时测定家禽组织中 16 种磺胺残留[J]. 分析化学, 2005, 34(9): 1252–1256.
Pang GF, Cao YZ, Zhang JJ, *et al.* Simultaneous determination of 16 sulfonamides in poultry meat by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 34(9): 1252–1256.

[11] 孙玉增, 徐英江, 刘慧慧, 等. 液相色谱-串联质谱法测定海产品中 21 种磺胺类药物残留[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 120–123.
Sun YZ, Xu YJ, Liu HH, *et al.* Simultaneous determination of 21 sulfonamide residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2010, 31(2): 120–123.

[12] Konak U, Certel M, Timur TBS. Development of an analysis method for determination of sulfonamides and their five acetylated metabolites in baby foods by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (orbitrap-MS) [J]. J Chromatogr B, 2017, 1057: 81–91.

[13] Nunes KSD, Assalin MR, Vallim JH, *et al.* Multiresidue method for quantification of sulfonamides and trimethoprim in tilapia fillet by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry

- using QuEChERS for sample preparation [J]. *J Anal Methods Chem*, 2018, 2018: 1–10.
- [14] He J, Zhang H, Yu K, *et al*. Rapid and direct mass spectrometric analysis of antibiotics in seawater samples [J]. *Analyst*, 2019, 144: 1898–1903.
- [15] Kipper K, Lillenberg M, Herodes K, *et al*. Simultaneous determination of fluoroquinolones and sulfonamides originating from sewage sludge compost [J]. *Sci World J*, 2017, 2017: 1–8.
- [16] Xu Y, Li J, Jiang L, *et al*. Simultaneous determination of sulfonamides and fluoroquinolones from environmental water based on magnetic double-template molecularly imprinting technique [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25(16): 16121–16134.
- [17] Jia W, Shi L, Chu X. Untargeted screening of sulfonamides and their metabolites in salmon using liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2018, 239: 427–433.
- [18] 黄志波, 王纪阳, 程雪梅, 等. 超高效液相色谱-质谱/质谱法同时测定蔬菜中 7 种磺胺的残留量[J]. *热带农业科学*, 2016, 36(6): 76–80.
- Huang ZB, Wang JY, Cheng XM, *et al*. Determination of 7 sulfanilamide in vegetables by UPLC-MS/MS spectrometry [J]. *Chin J Trop Agric*, 2016, 36(6): 76–80.
- [19] 吴小莲, 包艳萍, 向垒, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中 8 种磺胺类抗生素[J]. *环境化学*, 2013, 32(6): 1038–1044.
- Wu XL, Bao YP, Xiang L, *et al*. Simultaneous determination of eight sulfonamide antibiotics in vegetables using solid phase extraction and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2013, 32(6): 1038–1044.
- [20] 刘畅. 蔬菜中二十种磺胺类抗生素残留的 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测[J]. *黑龙江农业科学*, 2018, 6: 101–105.
- Liu C. Determination of sulfonamides in vegetables by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Heilongjiang Agric Sci*, 2018, 6: 101–105.
- [21] 张海娜, 欧宗和, 杨利锐. 电感耦合等离子体原子发射光谱法测定塑胶中镉、铅汞、铬含量的不确定度[J]. *化学分析计量*, 2007, 16(6): 7–10.
- Zhang HN, Ou ZH, Yang LR. Evaluation of the uncertainty for determination of 4 heavy metals in plastic by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry [J]. *Chem Anal Meter*, 2007, 16(6): 7–10.
- [22] 颜春荣, 徐春祥, 武中平, 等. 气质联用法测定含乳饮料中的邻苯二甲酸酯及其不确定度分析[J]. *乳液科学与技术*, 2012, 35(1): 36–39.
- Yan CR, Xu CX, Wu ZP, *et al*. GC-MS determination and uncertainty analysis of phthalate acid esters in milk-containing beverages [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2012, 35(1): 36–39.
- [23] Boyack BE, Catton I, Duffey RB, *et al*. Quantifying reactor safety margins part 1: An overview of the code scaling, applicability, and uncertainty evaluation methodology [J]. *Nucl Eng Des*, 1990, 119(1): 1–15.
- [24] 赖添财, 蔡恩兴. GC-MS 内标法测定苹果中哒螨灵残留量不确定度的评定[J]. *山西农业科学*, 2013, 41(9): 959–962.
- Lai TC, Cai EX. Uncertainty evaluation of the pyridaben residues in apples by correction factors of internal standard method in GC-MS [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2013, 41(9): 959–962.
- [25] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
- JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [26] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
- JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [27] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
- JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].
- [28] Commission Regulation (EC) No 333/2007. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs [Z].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

薛伟锋, 工程师, 主要研究方向为有机污染物检测。
E-mail: xwf526@163.com