

# 超高效液相色谱-串联质谱同位素内标法测定水产品中氟苯尼考及其代谢物残留量的不确定度评定

李文杰, 陈 涛, 倪建秀, 陈桂芳\*

(南京市农产品质量检测院, 南京 210036)

**摘 要: 目的** 采用超高效液相色谱-串联质谱内标法对水产品中氟苯尼考及其代谢产物氟苯尼考胺的残留量进行测量不确定度评定。**方法** 根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度的评定与表示》等相关理论, 通过建立数学模型, 分析各不确定度来源, 并进行量化, 得到综合标准不确定度。**结果** 当氟苯尼考含量为 11.0  $\mu\text{g/kg}$  时, 其扩展不确定度为 1.09  $\mu\text{g/kg}$  ( $k=2$ ); 当氟苯尼考胺含量为 7.25  $\mu\text{g/kg}$  时, 其扩展不确定度为 0.94  $\mu\text{g/kg}$  ( $k=2$ )。**结论** 本方法的不确定度主要来自标准溶液配制和曲线拟合。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 同位素内标法; 水产品; 氟苯尼考; 氟苯尼考胺; 不确定度评定

## Uncertainty evaluation of determination of florfenicol and its metabolite in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope-labelled internal standards

LI Wen-Jie, CHEN Tao, NI Jian-Xiu, CHEN Gui-Fang\*

(Nanjing Agricultural Products Quality Inspection Institute, Nanjing 210036, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty for determination of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope-labelled internal standards. **Methods** According to the theory of JJF 1059.1-2012 *Evaluation and expression of uncertainty in measurement* and other related theories, a mathematical model was established, then the sources of uncertainty were analyzed and quantified, the uncertainty components was calculated to obtain the synthetic standard uncertainty. **Results** When the florfenicol residue in aquatic products was 11.0  $\mu\text{g/kg}$ , the expanded uncertainty was 1.09  $\mu\text{g/kg}$  ( $k=2$ ). When the florfenicol amine residue was 7.25  $\mu\text{g/kg}$ , the expanded uncertainty was 0.94  $\mu\text{g/kg}$  ( $k=2$ ). **Conclusion** The major sources of uncertainty of measurement are the preparation of standards and the fitting of a curve.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotope-labelled internal standards; aquatic products; florfenicol; florfenicol amine; uncertainty evaluation

\*通讯作者: 陈桂芳, 高级工程师, 主要研究方向为农产品质量安全检测。E-mail: cgf824@163.com

\*Corresponding author: CHEN Gui-Fang, Senior Engineer, Nanjing Agricultural Products Quality Inspection Institute, No.169, Hanzhongmen Street, Jianye District, Nanjing 210036, China. E-mail: cgf824@163.com

## 1 引言

氟苯尼考(flornfenicol, FF)又名氟甲砜霉素,属于酰胺醇类合成药物,是氯霉素的替代品,具有广谱抗菌性,对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有抑制作用,因此在畜禽和水产养殖中常被用于预防和治疗细菌感染。氟苯尼考具有胚胎毒性<sup>[1,2]</sup>,我国农业农村部、国家卫生健康委员会和国家市场监督管理总局公告 2019 年第 114 号 GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》<sup>[3]</sup>规定残留标志物为氟苯尼考与氟苯尼考胺之和,在鱼(皮+肉)最大残留限量为 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

为保证氟苯尼考残留量检测结果的科学性,进行检测工作的实验室应根据相关认可技术规范要求进行测量不确定度的评定<sup>[4-6]</sup>。因现有国家标准、行业标准<sup>[7-10]</sup>等未见适用于同时检测水产品中氟苯尼考和氟苯尼考胺的方法,根据本文建立的残留检测方法<sup>[11]</sup>,对检测过程中可能影响检测结果的各个因素进行分析,并评定其不确定度。

不确定度是与测量结果相关联的参数,表征赋予被测量值的分散性,不确定度的评定在量值溯源方面具有重要意义<sup>[12]</sup>。国内目前对于兽药残留测定的不确定度评定多为液相色谱法<sup>[13,14]</sup>、液相色谱-串联质谱外标法<sup>[15,16]</sup>,鲜见液相色谱-串联质谱内标法评定不确定度的文献报道<sup>[17,18]</sup>,未见同时评定氟苯尼考及其代谢物残留量的不确定度,本文依据 CNAS-GL06《化学分析中不确定度的评估指南》<sup>[6]</sup>,对超高效液相色谱-串联质谱(ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法测定水产品中氟苯尼考及其代谢物残留量的不确定度进行评定,为检验结果的准确性及可靠性提供技术依据,同时也为其他实验室采用内标法评定不确定度提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Acquity UPLC I-Class 超高效液相色谱仪(德国 Waters 公司); QTRAP 5500 质谱仪(美国 Sciex 公司); GM200 刀式研磨仪(德国 Retsch 公司); BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司); KS 501 振荡器、MS3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); Allegra X-30R 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); MV5 全自动平行浓缩仪(北京莱伯泰科公司)。

氟苯尼考对照品(扩展不确定度为 0.89%,纯度 99.8%,德国 DR.E 公司); 氟苯尼考胺对照品(纯度 99.8%,扩展不确定度为 0.2%,德国 Witega 公司); 氘代氟苯尼考(氟苯尼考-d3)对照品(纯度 98%,加拿大 TRC 公司)。

乙腈、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、丙酮(色谱纯,美国 TEDIA 公司); 乙酸铵(色谱纯,美国 Sigma-aldrich 公

司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水; CNW Si SPE 柱(6 mL, 500 mg, 上海安谱科学仪器有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

分别精密称取氟苯尼考、氟苯尼考胺 6.29、5.38 mg,用甲醇溶解并定容至 50 mL,配制成浓度分别为 125.5、107.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准储备液,然后精密量取 398.4  $\mu\text{L}$  氟苯尼考、465.5  $\mu\text{L}$  氟苯尼考胺标准储备液至 50 mL 容量瓶中,用甲醇配制成 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准中间液。精密量取 1 mL 混合标准中间液至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 100 ng/mL 混合标准工作液,量取 1 mL 100 ng/mL 混合标准工作液至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 10 ng/mL 混合标准工作液,量取 1 mL 10 ng/mL 混合标准中间液至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 1 ng/mL 混合标准工作液。同时将 1 mg 氟苯尼考-d3 用甲醇溶解并定容至 10 mL,配制成浓度分别为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的内标标准储备液,精密量取 1 mL 氟苯尼考-d3 内标标准储备液至 100 mL 容量瓶中,用甲醇配制成 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的内标标准工作液。标准溶液均置于-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 2.2.2 空白添加标准曲线的制备

准确称取 8 份 2.00 g(精确到 0.01 g)空白样品于 50 mL 离心管内,分别添加 100 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准工作液各 1 mL、500  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ ,添加 1 ng/mL 混合标准工作液 1 mL、200  $\mu\text{L}$  及 10  $\mu\text{L}$  1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标标准工作液,制备得浓度为 0.1、0.5、1、2.5、5、10、25、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  系列空白添加试料,按 2.2.2~2.2.3 步骤操作,供 UPLC-MS/MS 测定,依次进样,每个浓度重复进样 2 次,将测得的峰面积比值与对应浓度比值加权线性拟合,绘制标准曲线。

#### 2.2.3 样品前处理

##### (1) 采样和试样制备

抽取有代表性的样品,鱼类至少取 3 尾<sup>[19]</sup>,去头、骨、内脏,取肌肉、鱼皮等可食部分切块至 4 cm 以下,按自然比例放入刀式研磨仪,2500 r/min 研磨 40 s,绞碎混合均匀成鱼糜后备用;试样量为 400 g,分为 2 份,其中一份用于检验,另一份作为留样。

##### (2) 提取

称取 2.00 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标标准工作液 10  $\mu\text{L}$ ,再加入乙腈:氨水(98:2, V/V)溶液 10 mL,于涡旋混合器上混合 1 min 后 250 r/min 的转速振荡 20 min,以 4  $^{\circ}\text{C}$ , 10000 r/min,离心 5 min,取上清液,再向沉淀中加入 10 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次,合并 2 次提取上清液,40  $^{\circ}\text{C}$  水浴中氮吹至近干,然后用 5 mL 丙酮:正己烷(1:9, V/V)溶液复溶待用。

##### (3) 净化

将复溶后的提取液全部转移至经 5 mL 丙酮:正己烷

(1:9,  $V/V$ )溶液活化的 CNW Si SPE 柱中, 挤干后用 5 mL 丙酮:正己烷(6:4,  $V/V$ )溶液洗脱, 洗脱液在 40 °C 水浴中氮吹至近干。用 1 mL 乙腈:水(3:7,  $V/V$ )溶液溶解, 再加入 2 mL 正己烷, 4000 r/min, 离心 10 min, 取下层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

2.2.4 液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC CSH  $\text{C}_{18}$ (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 前端连接 ACQUITY UPLC CSH 保护柱(2.1 mm $\times$ 5 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )。流动相 A 为 2 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B 为 2 mmol/L 乙酸铵乙腈溶液。梯度洗脱程序为 0.2~6 min, 5%B~60%B, 6~7 min, 60%B~95%B, 7~8 min, 维持 95%B, 8~8.1 min, 95%B~5%B, 8.1~9.5 min, 维持 5%B, 流速 0.3 mL/min, 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 流路在 1~6 min 之间进入质谱, 在 1 min 之前和 6 min 之后切向废液, 柱温为 40 °C。

(2)质谱条件

电喷雾离子源 ESI; 0~2.5 min, 进行正离子模式扫描(氟苯尼考胺), 2.5~9.5 min, 进行负离子模式扫描(氟苯尼考、氟苯尼考-d3), 雾化气压力为 60 psi, 气帘气压力为 30 psi, 辅助加热气压力为 50 psi, 碰撞气设置为 Medium, 以上 4 种气体均为氮气, 离子源温度为 600 °C, 正离子化电压为 4500 V, 负离子化电压为-4500 V, 多反应监测(MRM)采集模式, 其他参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 测量不确定度数学模型

根据测定方法和结果计算公式, 建立水产品中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留测定的数学模型, 如式(1)所示。

$$\omega = \frac{C_0 \times V}{m \times R} = \frac{\frac{A}{A_i} - B_0}{B_1} \times \frac{V}{m} \times R \tag{1}$$

式中:  $\omega$  为试样中被测物残留量质量分数,  $\mu\text{g/kg}$ ;

$C_0$  样品溶液中被测物的质量浓度, ng/mL;  
 $V$  为样品溶液定容体积, mL;  
 $m$  为试样的质量, g;  
 $A$  为样品溶液中被测物的峰面积;  
 $A_i$  为样品溶液中内标物的峰面积;  
 $B_1$  为回归方程的斜率;  
 $B_0$  为回归方程的截距;  
 $R$  为回收率。

表 1 质谱参数  
Table 1 Chromatogram parameters

| 名称      | 母离子<br>( $m/z$ ) | 子离子<br>( $m/z$ ) | 去簇电<br>压/V | 碰撞电压<br>/eV |
|---------|------------------|------------------|------------|-------------|
| 氟苯尼考胺   | 248.0            | 230.1*           | 120        | 15          |
|         |                  | 130.0            | 120        | 28          |
| 氟苯尼考    | 356.0            | 336.0*           | -100       | -14         |
|         |                  | 185.1            | -100       | -25         |
| 氟苯尼考-d3 | 359.0            | 188.0*           | -130       | -25         |

注: \*为定量离子

3.2 测量不确定度的来源及量化

根据测定过程, 对试样中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量测定结果有影响的各不确定度的分量来源进行分析, 从图 1 可见具体引入的不确定度来源, 主要有: 被测物的质量分数( $\omega$ )、样品称量  $m$ 、仪器测量、回收率( $R$ )、标准系列溶液配制( $V_s$ )、定容体积( $V$ )、方法重复性( $rep$ )等。因仪器波动引入的不确定度主要是仪器重复进样时定量重复性产生的不确定度。在标准系列溶液和样品待测液中内标物含量一致时, 内标物的纯度、储备液和工作液的配制等均不影响样品中的目标物含量, 故本文仅评估内标物加入的体积引入的不确定度。

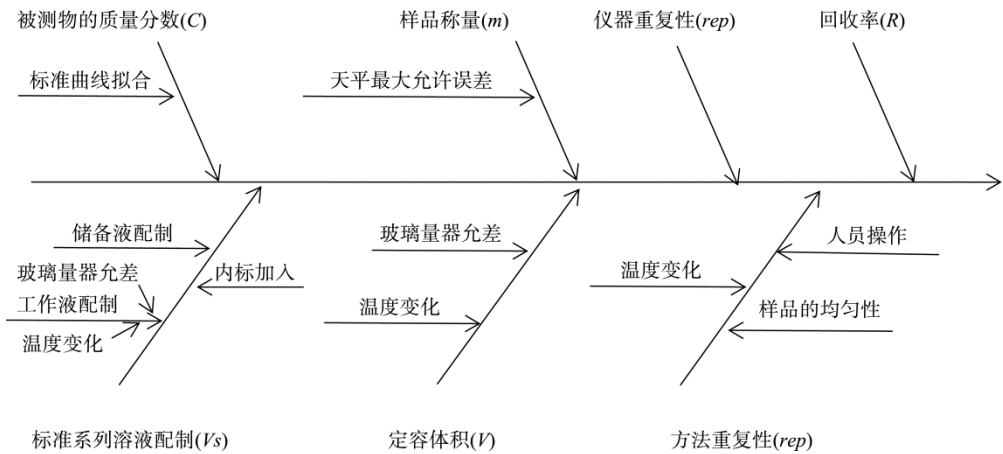


图 1 不确定度来源

Fig.1 Graph of uncertainty component sources

3.2.1 被测物的质量分数引入的标准不确定度  $u_r(\omega)$

(1)标准品纯度引入的相对标准不确定度 $u_r(p)$

氟苯尼考标准品纯度为 99.82%(g/g), 扩展不确定度为 0.89%(g/g), 根据扩展因子  $k=2$ , 其引入的相对标准不确定度为  $u(p_{FF}) = \frac{0.89\%}{2 \times 99.82\%} = 0.00446$ 。

氟苯尼考胺标准品纯度为 99.8±0.2%, 按矩形分布 ( $k=\sqrt{3}$ ), 其引入的相对标准不确定度为  $u(p_{FA}) = \frac{0.2\%}{\sqrt{3} \times 99.8\%} = 0.00116$ 。

(2)标准品称量引入的相对标准不确定度 $u(m)$

根据称量所使用天平检定证书, 可知其最大允许允差为±0.1 mg, 按矩形分布( $k=\sqrt{3}$ ), 天平称量过程中引入的标准不确定度,  $u_r(m_{FF}) = \frac{0.1}{\sqrt{3} \times 6.29} = 0.00918$ ,  $u_r(m_{FA}) = \frac{0.1}{\sqrt{3} \times 5.38} = 0.0107$ 。

(3)标准溶液配置过程中体积引入的相对标准不确定度 $u_r(Vs)$

溶液体积主要有 3 个不确定度来源<sup>[6]</sup>: 1 是确定容量瓶或移液器内部体积时的不确定度, 依据 JJG 646-2006《移液器检定规程》和 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》<sup>[20]</sup>要求, 按矩形分布( $k=\sqrt{3}$ ); 2 是定容至刻度的变异性, 移液器依据测量重复性数据, 按矩形分布( $k=\sqrt{3}$ )计算; 3 是容量瓶或移液器和溶液温度与校准时的温度不同, 温度在 (20±5) °C 的实验条件下, 量器受温度变化的影响很小, 本研究忽略未计。标准溶液定容过程中所使用溶剂为甲醇。20 °C 时甲醇的膨胀系数为  $1.18 \times 10^{-3} / ^\circ\text{C}$ , 按矩形分布,  $k=\sqrt{3}$ 。标准溶液配制过程中体积变化引入的相对标准不确定度为

$5 \times 1.18 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.00340$ 。

a. 配置标准储备液引入的相对标准不确定度 $u(V_1)$

标准储备液是将标准物质使用甲醇溶解, 并定容于 50 mL 棕色容量瓶, 体积引入的标准不确定度为  $u(V_1) = \sqrt{(0.05/\sqrt{3})^2 + (50 \times 0.00340)^2} = 0.172 \text{ mL}$ 。相对标准不确定度为  $\frac{u(V_1)}{V_1} = 0.00344$ 。

b. 配制混合标准中间液、工作液引入的相对标准不确定度 $u(V_2)$

1.0 μg/mL 氟苯尼考、氟苯尼考胺混合标准中间液的配制, 所用移液器为 1000 μL 移液器, 使用体积为 398.4 μL 和 465.5 μL, 按照不确定度从高估计的原则, 参照使用 100 μL 来评估不确定度。所用容量瓶为 50 mL, 溶剂为甲醇, 则混合标准中间液的配制过程使用 1000 μL 移液器吸取液体 100 μL 1 次, 50 mL 容量瓶 1 次。

100、10、1 ng/mL 混合标准工作液的配制, 使用 1000 μL 移液器和 10 mL 容量瓶各 3 次。

配制混合标准中间液、工作液引入的相对标准不确定度见表 2。

c. 配制标准曲线工作液引入的相对标准不确定度 $u(V_3)$

配制标准工作曲线, 吸取标准溶液时, 使用 200 μL 移液器 3 次, 500 μL 移液器 2 次, 1000 μL 移液器 3 次。标准曲线配制中体积引入的相对标准不确定度见表 3。

标准溶液配置过程中体积引入的相对标准不确定度表 4。

表 2 混合标准中间液、工作液配制中体积引入的相对标准不确定度  
Table 2 Uncertainty of volume in preparation of mixed standard intermediate and working liquid

| 项目                      |             | 1 mL 移液器 | 1 mL 移液器 | 10 mL 容量瓶 | 50 mL 容量瓶 |
|-------------------------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| 体积误差                    | 吸取溶液体积/mL   | 0.1      | 1        | 10        | 50        |
|                         | 容量允差/±%不确定度 | 2.0      | 1.0      | 0.2       | 0.1       |
|                         | 相对标准不确定度/%  | 0.0115   | 0.00577  | 0.00115   | 0.000577  |
| 重复性                     | 测量重复性/%     | 1.0      | 0.5      | ----      | ----      |
|                         | 相对标准不确定度/%  | 0.00577  | 0.00289  | ----      | ----      |
| 温度波动                    | 相对标准不确定度/%  |          |          | 0.00340   |           |
| 相对合成标准不确定度/%            |             | 0.0133   | 0.00729  | 0.00359   | 0.00344   |
| 使用次数                    |             | 1        | 3        | 3         | 1         |
| 最终相对合成标准不确定度/% $u(V_2)$ |             |          |          | 0.0197    |           |

表 3 标准曲线配制中体积引入的相对标准不确定度  
Table 3 Uncertainty of volume introduced in standard curve preparation

| 项目                          |              | 200 μL 移液器 | 1000 μL 移液器 | 1000 μL 移液器 |
|-----------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| 标液移取                        | 吸取溶液体积 μL    | 200        | 500         | 1000        |
|                             | 体积误差         |            |             |             |
|                             | 容量允差/±%      | 1.5        | 1.0         | 1.0         |
|                             | 相对标准不确定度/%   | 0.00866    | 0.00577     | 0.00577     |
|                             | 测量重复性/%      | 1.0        | 0.5         | 0.5         |
|                             | 标准不确定度/μL    | 0.00577    | 0.00289     | 0.00289     |
|                             | 温度波动         |            |             |             |
|                             | 相对标准不确定度/%   |            | 0.00340     |             |
|                             | 相对合成标准不确定度/% | 0.0109     | 0.00729     | 0.00729     |
| 使用次数                        |              | 3          | 2           | 3           |
| 相对合成标准不确定度/% $u_r(V_{FF2})$ |              |            | 0.0249      |             |

表 4 标准溶液配置过程中体积引入的相对标准不确定度  $u_r(Vs)$   
Table 4 Uncertainty of volume introduced during standard solution configuration

| 描述    |              | 相对标准不确定度 $u(x)/x$ |
|-------|--------------|-------------------|
| $V_1$ | 储备液配制(1)     | 0.00346           |
| $V_2$ | 中间液、工作液配制(2) | 0.0197            |
| $V_3$ | 工作曲线配制(3)    | 0.0249            |
| $V_s$ | 相对合成标准不确定度/% | 0.0319            |

(4)加入内标引入的相对标准不确定度  
测定过程中 100 ng/mL 内标标准工作液加入体积为 100 μL, 体积引入的相对标准不确定度为  $u_r(V_{FF1}) = 0.0133$ 。

(5)标准曲线拟合引入的相对标准不确定度  
本实验对氟苯尼考, 制备了 8 个不同浓度点的标准工作液, 每个浓度点检测 2 次, 以外标峰面积/内标峰面积的比值( $A/A_i$ )为纵坐标, 标准溶液浓度( $C_i$ )为横坐标, 采用 Origin pro 8, 最小二乘法拟合, 使用权重  $1/x^2$ , 以保证低浓度数据的作用, 得出目标物的回归方程 ( $Y=B_0+B_1X$ )。氟苯尼考线性方程为  $y=0.68935X+0.00478$  ( $r=0.9963$ ), 氟苯尼考胺线性方程为  $Y=0.5482X-0.00948$  ( $r=0.9935$ ), 详见表 5。

标准曲线拟合引入的不确定度见式(3)。  
$$u = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{\sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2}}$$
 式(3)

式(3)中:  $u$ 是标准曲线拟合引入的不确定度;  
 $S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 C_j)]^2}{n-2}}$ , 为残差标准差;  
 $A/A_i$ 为第*i*个外标峰面积和内标峰面积的比值;  
 $B_0$ 为回归方程的截距;

$B_1$ 为回归方程斜率;  
 $C_j$ 第*j*点的质量浓度值;  
 $C_0$ 为样品的测定值;  
 $\bar{C}$ 为标准溶液质量浓度的平均值(*n* 次测试);  
*i* 为标准溶液编号的下标;  
*j* 为获得标准曲线的测量次数的下标;  
 $p=3$  为样品测定液测量次数;  
 $n=8 \times 2=16$ , 为测试标准溶液的次数。  
标准曲线拟合引入的相对标准不确定度  $u_r(C_0)$ 用式(4)计算, 结果见表 6。

$$u_r(C_0) = \frac{u}{C_0}$$
 式(4)  
被测物的质量分数引入的标准不确定度见表 7。

表 5 内标法工作曲线  
Table 5 Linear curve of internal standard method

| 质量浓度比 $\rho_i$                     | 峰面积比值 $A_i$ |                      |                     |       |
|------------------------------------|-------------|----------------------|---------------------|-------|
|                                    | 氟苯尼考        |                      | 氟苯尼考胺               |       |
| 0.02                               | 0.018       | 0.020                | 0.001               | 0.001 |
| 0.1                                | 0.062       | 0.063                | 0.058               | 0.056 |
| 0.2                                | 0.137       | 0.138                | 0.111               | 0.107 |
| 0.5                                | 0.374       | 0.383                | 0.238               | 0.217 |
| 1                                  | 0.728       | 0.732                | 0.526               | 0.531 |
| 2                                  | 1.442       | 1.446                | 0.995               | 0.994 |
| 5                                  | 3.414       | 3.389                | 2.744               | 2.751 |
| 10                                 | 6.947       | 6.889                | 5.384               | 5.376 |
| 线性方程 $Y=B_0+B_1X$<br>(权重 $1/x^2$ ) |             | $Y=0.68935X+0.00478$ | $Y=0.5482X-0.00948$ |       |
| 相关系数 $r$                           |             | 0.9963               | 0.9935              |       |

表 6 相对标准不确定度  
Table 6 Results of relative standard uncertainty

| 化合物   | 样品质量浓度比 $\rho_0$ | 标准溶液平均质量浓度比 $\rho_1$ | 残差的标准差 $s$ | 不确定度 $u$ | 相对标准不确定度 $u_r(\rho_0)$ |
|-------|------------------|----------------------|------------|----------|------------------------|
| 氟苯尼考  | 2.21             | 1.64                 | 0.0561     | 0.0512   | 0.0232                 |
| 氟苯尼考胺 | 1.45             | 1.64                 | 0.0593     | 0.0685   | 0.0472                 |

表 7 质量分数引入的相对标准不确定度  
Table 7 Uncertainty introduced by mass fraction

| 描述        |            | 相对标准不确定度 $u(x)/x$ |         |
|-----------|------------|-------------------|---------|
|           |            | 氟苯尼考              | 氟苯尼考胺   |
| $p$       | 标准品纯度(1)   | 0.00446           | 0.00116 |
| $m$       | 标准品称量(2)   | 0.00918           | 0.0107  |
| $V_S$     | 配制过程(3)    | 0.0319            | 0.0319  |
| $V_{FFI}$ | 内标加入(4)    | 0.0133            | 0.0133  |
| $\rho_0$  | 曲线拟合(5)    | 0.0232            | 0.0472  |
| $C$       | 相对合成标准不确定度 | 0.0429            | 0.0594  |

3.2.2 样品称量引入的相对标准不确定度  $u_r(m)$

样品采用百分之一天平称量, 根据其检定证书, 可知其最大允许误差 $\pm 0.01$  g, 按矩形分布( $k=\sqrt{3}$ )。称量样品为 2.00 g, 天平称量过程中引入的标准不确定度为  $u(m)=0.01/\sqrt{3}=0.00577$ ,  $u_r(m)=u(m)/m=0.00289$ 。

3.2.3 定容体积引入的相对标准不确定度  $u_r(V)$

使用 1000  $\mu$ L 移液器移取 1.00 mL 乙腈水溶液溶解残渣, 参照 3.2.1 计算, 移液器引入的相对标准不确定度  $u_r(V)=\sqrt{0.0115^2+0.0057^2+0.00192^2}=0.0130$ 。

3.2.4 回收率引入的相对标准不确定度  $u_r(R)$

样品氟苯尼考的平均回收率为 108%, 标准偏差( $s$ )为 3.9%。标准不确定度采用平均值的标准偏差计算得到  $u(\overline{Rec})=\frac{0.039}{\sqrt{6}}=0.0159$ ,  $u_r(\overline{Rec})=\frac{0.0159}{108\%}=0.0147$ 。

用  $t$  检验来确定平均回收率是否与 1.0 有显著性差异。检验统计量  $t$  用下式来计算:  $t=\frac{|1-\overline{Rec}|}{u(\overline{Rec})}=\frac{|1-1.08|}{0.0159}=5.03$ 。该值与 95%置信度,  $n-1$  自由度下的双侧临界值  $t_{crit}$  比较,

假如  $t$  大于或等于  $t_{crit}$  值, 则  $\overline{Rec}$  与 1 有显著性差异。

$t=5.03\geq t_{crit,5}\cong 2.571$ ,  $\overline{Rec}$  与 1 有显著性差异。因此  $\overline{Rec}$  应包含在结果的计算中。

同步骤计算氟苯尼考胺的  $u(\overline{Rec})=\frac{0.033}{\sqrt{6}}=0.0134$ ,  $u_r(\overline{Rec})=\frac{0.0134}{73.9\%}=0.0181$ 。  $t=\frac{|1-\overline{Rec}|}{u(\overline{Rec})}=\frac{|1-0.739|}{0.0134}=19.48$ ,  $\overline{Rec}$  应包含在结果的计算中。

3.2.5 方法重复性引入的相对标准不确定度  $u_r(rep)$

分别称取 6 份样品按照检测方法检测, 结果见表 8。

3.3 测量不确定度的合成

合成标准不确定度见表 9,  $u(\omega)=u_r(\omega)\times\omega$ , 取包含因子  $k=2$ (近似 95%置信概率), 扩展不确定度  $U=k\times u(\omega)$  则最终氟苯尼考的测量结果为  $(11.0\pm 1.09)$   $\mu$ g/kg, 不确定度来源分布图见图 2, 氟苯尼考胺的测量结果为  $(7.25\pm 0.94)$   $\mu$ g/kg, 不确定度来源分布图见图 3。

表 8 样品检测氟苯尼考和氟苯尼考胺含量  
Table 8 Results of florfenicol and florfenicol amine content in samples

| 名称    | 测试含量 $\omega/(\mu\text{g/kg})$ |       |       |       |       |       | 平均含量 $\bar{\omega}/(\mu\text{g/kg})$ | 标准偏差 $s/(\mu\text{g/kg})$ | 不确定度 $u$ | 相对标准不确定度 $u_r(rep)$ |
|-------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------------|---------------------------|----------|---------------------|
|       | 1                              | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |                                      |                           |          |                     |
| 氟苯尼考  | 10.97                          | 11.39 | 10.78 | 10.18 | 10.80 | 10.70 | 10.80                                | 0.39                      | 0.16     | 0.015               |
| 氟苯尼考胺 | 7.64                           | 7.18  | 6.88  | 7.64  | 7.30  | 7.72  | 7.39                                 | 0.33                      | 0.13     | 0.018               |

| 表 9 不确定度分量评定表                                      |             |                   |         |
|----------------------------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Table 9 Table of uncertainty components evaluation |             |                   |         |
| 描述                                                 |             | 相对标准不确定度 $u(x)/x$ |         |
|                                                    |             | 氟苯尼考              | 氟苯尼考胺   |
| $C$                                                | 质量分数(1)     | 0.0429            | 0.0594  |
| $m$                                                | 样品称量(2)     | 0.00289           | 0.00289 |
| $V$                                                | 定容体积(3)     | 0.0130            | 0.0130  |
| $R$                                                | 偏倚(回收率)(4)  | 0.0147            | 0.0130  |
| $rep$                                              | 精密度(重复性)(5) | 0.0150            | 0.0180  |
| $\omega$                                           | 相对合成标准不确定度  | 0.0495            |         |
| $\omega$                                           | 合成标准不确定度    | 0.545             | 0.470   |
|                                                    | 扩展不确定度      | 1.09              | 0.94    |

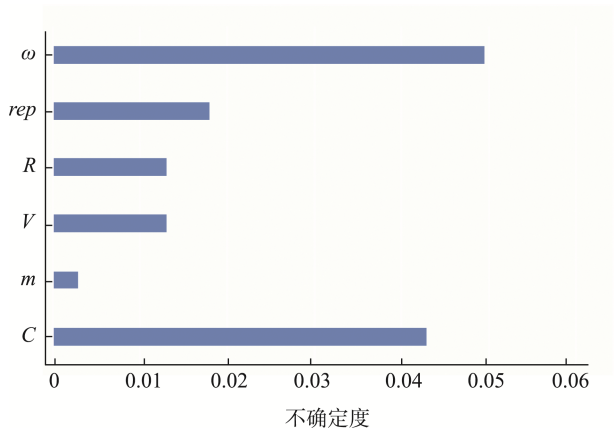


图 2 水产品中氟苯尼考残留量测定的不确定度分布图

Fig.2 Distribution of uncertainty in determination of florfenicol residues in aquatic products

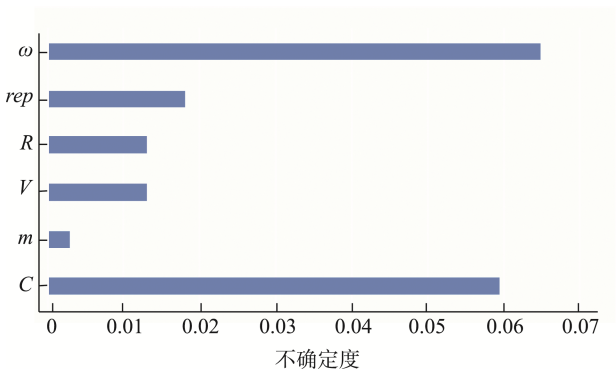


图 3 水产品中氟苯尼考胺残留量测定的不确定度分布图

Fig.3 Distribution of uncertainty in determination of florfenicol amine residues in aquatic products

4 结论与讨论

根据测量不确定度的评定方法, 本研究对本实验室

采用自建立的检测方法测定水产品中氟苯尼考及其代谢物残留量的不确定度来源进行分析, 通过建立模型, 评定和计算测定过程中的各不确定度分量。在标准系列溶液和样品待测液中内标物含量一致时, 内标物的纯度、储备液和工作液的配制等均不影响样品中的目标物含量, 故仅将内标物加入的体积作为不确定度来源。结果表明, 水产品中氟苯尼考及其代谢物残留量测定的不确定度主要来自于样品前处理过程中的标准曲线工作液配制、曲线拟合, 与候美玲等<sup>[18]</sup>评估结果一致, 其次是内标加入、样品称量、回收率、定容体积和重复性。因此, 在日常检测水产品中氟苯尼考及其代谢物残留量的过程中, 应尽量选用容量允差相对较小的移液器和容量瓶, 避免使用 2  $\mu$ L 和 10  $\mu$ L 移液器, 同时以满刻度量程使用, 以降低整个检测过程中可能产生的不确定度, 提高检测结果的准确性。

参考文献

[1] Holt DE, Andrews CM, Payne JP, *et al.* The myelotoxicity of chloramphenicol: In vitro and in vivo studies: II: *In vivo* myelotoxicity in the B6C3F mouse [J]. Hum Exp Toxicol, 1998, 17: 8–17.

[2] Festing MF, Diamanti P, Turton JA. Strain differences in haematological response to chloramphenicol succinate in mice: Implications for toxicological research [J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39: 375–383.

[3] GB 31650–2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S]. GB 31650–2019 National food safety standard-Maximum residue limits for veterinary drugs in foods [S].

[4] 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].

[5] CNAS-GL 05: 2016 测量不确定度要求的实施指南[S]. CNAS-GL 05: 2016 Guidance on the application of the requirements for measurement uncertainty [S].

[6] RB/T 214–2017 检验检测机构资质认定能力评价检验检测机构通用要求[S]. RB/T 214–2017 Competence assessment for inspection body and laboratory mandatory approval-Genaral requirements for inspection body and laboratory [S].

[7] GB/T 22338–2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定[S]. GB/T 22338–2008 Determination of multiresidues of chloramphenicols in animal-original food [S].

[8] SN/T 1865–2016 出口动物源食品中甲砒霉素、氟甲砒霉素和氟苯尼考胺残留量的测定 液相色谱-质谱-质谱法[S]. SN/T 1865–2016 Determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine residues in animal-derived food for export-LC-MS/MS method [S].

[9] 农业部 958 号公告-13-2007 水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量的测定 气相色谱法[S]. 农业部 958 号公告-13-2007 Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in fishery products-Gas chromatography method [S].

[10] 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[S].

- GB/T 20756-2006 Method for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in edible animal muscles, liver and aquatic products-LC-MS-MS method [S].
- [11] 陈涛, 倪建秀, 陈桂芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱检测鸡蛋、鸡肉和猪肉中酰胺醇类药物残留[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(6): 66-75.  
Chen T, Ni JX, Chen GF, *et al.* Simultaneous determination of amphenicol residues in eggs, chicken and pork by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anim Husb Vet Med, 2020, 52(6): 66-75.
- [12] CNAS-GL 006: 2019 化学分析中不确定度的评估指南[S].  
CNAS-GL 006: 2019 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [13] 李彬. 高效液相色谱法测定 Fapas 能力验证样品中咖啡因含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(8): 2511-2517.  
LI B. Uncertainty evaluation of determination of caffeine in Fapas proficiency testing samples by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(8): 2511-2517.
- [14] 陈梦, 邹小龙, 范蕾, 等. 高效液相色谱法测定牛奶中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 含量的不确定度评定[J]. 分析测试技术与仪器, 2020, 26(1): 71-75.  
Chen M, Zou XL, Fan L, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by high performance liquid chromatography method [J]. Anal Test Technol Instrum, 2020, 26(1): 71-75.
- [15] 徐淑媛, 韩媛媛, 陈砚朦, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中氯霉素残留量的不确定度评定[J]. 华南预防医学, 2014, (5): 454-458.  
Xu SN, Han YY, Chen YM, *et al.* Uncertainty evaluation of chloramphenicol determination in animal origin by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. South China J Prev Med, 2014, 40(5): 454-458.
- [16] 黄伟蓉, 张朋杰, 张宪臣, 等. 高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定鸡蛋中氯霉素残留量的不确定度评定[J]. 现代食品, 2018, (24): 76-82.  
Huang WR, Zhang PJ, Zhang XC, *et al.* HPLC-MS/MS uncertainty evaluation indetermination of chloramphenicol residues in eggs [J]. Mod Food, 2018, (24): 76-82.
- [17] 刘柱, 徐潇颖, 赵超群, 等. 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量的不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 206-214.  
Liu Z, Xu XY, Zhao CQ, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of malachite green, crystal violet and their metabolites in aquatic products by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(5): 206-214.
- [18] 候美玲, 黄思瑜, 周纯洁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱同位素内标法检测蜂蜜中诺氟沙星残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4730-4734.  
Hou ML, Huang SY, Zhou CJ, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of norfloxacin residue in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry isotope internal standard method [J]. J. Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4730-4734.
- [19] GB/T 30891-2014 水产品抽样规范[S].  
GB/T 30891-2014 Practice of sampling plans for aquatic products [S].
- [20] JJG 196-2006 常用玻璃量器[S].  
JJG 196-2006 Working glass container [S].

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



李文杰, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为农产品质量安全检测与风险评估研究。  
E-mail: 452767077@qq.com



陈桂芳, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为农产品质量安全检测。  
E-mail: cgf824@163.com