

液相色谱-串联质谱法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的西地那非含量的不确定度评定

谢柏艳, 李文博, 杨玉平*

(武汉药品医疗器械检验所, 武汉 430075)

摘要: 目的 对液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定抗疲劳类保健食品中非法添加的西地那非含量的不确定度进行评定。**方法** 根据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》、JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》, 采用液相色谱-串联质谱法测定抗疲劳类保健食品中西地那非残留量, 对测定方法中的关键环节进行分析, 对各不确定度分量进行识别和量化, 计算出合成不确定度和扩展不确定度。**结果** 当西地那非含量为 0.927 $\mu\text{g/g}$, $k=2$ (置信水平 95%)时, 扩展不确定度为 0.06 $\mu\text{g/g}$, 测试结果表示为(0.927 \pm 0.06) $\mu\text{g/g}$ 。**结论** 本方法为液相色谱-串联质谱法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的西地那非含量的不确定度提供了参考依据。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 抗疲劳类保健食品; 西地那非; 不确定度

Uncertainty evaluation for the determination of sildenafil illegally added in anti-fatigue health food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIE Bai-Yan, LI Wen-Bo, YANG Yu-Ping*

(Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of sildenafil illegally added in anti-fatigue health food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** According to JJF 1059.1—2012 *Measurement uncertainty evaluation and presentation* and JJF 1135—2005 *Evaluation of measurement uncertainty in chemical analysis*, the sildenafil residues in anti-fatigue health food was measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Through the analysis of key links in the determination method, each component of uncertainty was identified and quantified, then, the combined uncertainty and expanded uncertainty were calculated. **Results** The sildenafil content was 0.927 $\mu\text{g/g}$, $k=2$ (confidence level was 95%), and the expanded uncertainty was 0.06 $\mu\text{g/g}$. The assay result of the sample was (0.927 \pm 0.06) $\mu\text{g/g}$. **Conclusion** The established method provides important reference for the uncertainty evaluation of determination of sildenafil illegally added in dietary supplement of aphrodisiacs by LC-MS/MS.

KEY WORDS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; anti-fatigue health food; sildenafil; uncertainty

*通信作者: 杨玉平, 硕士, 工程师, 主要研究方向为理化检验。E-mail: 280731104@qq.com

*Corresponding author: YANG Yu-Ping, Master, Engineer, Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075, China. E-mail: 280731104@qq.com

0 引言

保健食品作为膳食补充剂并非适用于所有消费群体,由于民众对于保健食品的定位不够清晰,具有过高的期待值,不法分子打着绿色、天然的幌子,通过添加化学成分来牟取暴利^[1-3]。目前市面上补肾壮阳类保健食品,由于其特殊用途,往往非法添加了西地那非、他达那非等处方药,以求达到速效、高效的目的。剂量不规范、无医生的专业指导,非法添加的化学药品成分对消费者危害很大,尤其是对不宜人群,主要表现在中枢神经、循环和视觉系统,较为严重的不良反应主要表现在循环系统,如心律失常、心肌梗死、心脏猝死、脑血管出血、高血压等。这一现象已引起市场监督管理部门和药品监督管理部门的高度重视,并针对该类保健食品陆续发布了药品检验补充检验方法和检验项目批准件^[4-5],很多报道也讨论了该类保健食品中非法添加化学成分的测定方法^[6-10]。

在测定的过程中会存在很多不确定的因素,如在取样、样品制备、标准物质选择、分析测量及数据处理等每一个环节,这些不确定的因素造成最终的测量值都会存在不能肯定的部分,是与测量结果相联系的参数,用于表征合理地赋予被测量的量值分散程度,即不确定度^[11]。本研究采用液相色谱-串联质谱法对抗疲劳类保健食品中非法添加的西地那非含量进行测定^[12],依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》^[13]、JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》^[14],对保健食品中非法添加的西地那非检测的不确定度进行测量和分析,以期对抗疲劳类保健食品中非法添加西地那非的检测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AB Sciex 高效液相色谱-串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司);XS105DU 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);超声波清洗器(武汉嘉鹏电子有限公司);L530 医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

西地那非对照品(510068-201401,纯度为 99.9%,中国食品药品检定研究院);甲醇(批号 178506)、乙腈(批号 186350,色谱纯,美国 Fisher 公司);甲酸(批号 L6C0R28,分析纯,北京百灵威科技有限公司);乙酸铵(批号 20160118,分析纯,国药集团);实验用水为 Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件:色谱柱型号:资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ MG III(2.1 mm×150 mm, 5 μm);流动相:流动相 A: 0.02 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸);乙腈(85:15, V:V);

流动相 B: 甲醇:乙腈(85:15, V:V),梯度洗脱程序见表 1;柱温: 35 °C;进样体积: 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% | 流速/(mL/min) |
|--------|---------|---------|-------------|
| 0.01 | 80 | 20 | 0.2 |
| 10.00 | 20 | 80 | 0.2 |
| 15.00 | 80 | 20 | 0.2 |
| 20.00 | 80 | 20 | 0.2 |

(2)质谱条件:电喷雾离子源正离子(electron spray ionization, ESI+);扫描方式:正离子扫描;监测方式:多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);喷雾电压: 5500 V;去溶剂温度: 500 °C;气帘气: 40 psi;雾化气: 50 psi;辅助加热气: 50 psi;监测离子对: 474.9/57.9。

1.2.2 溶液的制备

(1)对照品溶液的制备:精密称取西地那非对照品约 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加乙腈适量,超声溶解,冷至室温,加乙腈定容至刻度,摇匀,作为对照品储备液(100 μg/mL),精密吸取对照品储备液 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中加入 50%乙腈水溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液(5 μg/mL)。分别用移液器移取对照品溶液 0.20、0.50、1.0 mL 各 2 份,分别依次置于 100 mL、10 mL 量瓶中,加 50%乙腈水溶液至刻度,摇匀,即得浓度为 10、25、50、100、250、500 μg/L 对照品系列溶液。

(2)样品溶液的制备:取样品 10 片,称定,研细混匀,精密称取混匀试样约 1.00 g (1 片重)至 50 mL A 级量瓶中,加入乙腈适量,超声 30 min,冷至室温,用乙腈定容至刻度(提取),摇匀,3000 r/min 离心 10 min,用移液器移取上清液 1.0 mL 至 50 mL 量瓶中,用 50%乙腈水溶液稀释至刻度(稀释),摇匀,经 0.22 μm 滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.2.3 数学模型的建立

样品中的西地那非含量计算见式(1):

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中: X ——供试品中西地那非的含量, μg/g;

c ——由校准曲线得出的样品溶液中西地那非的浓度, μg/L;

m ——样品取样量, g;

V ——2500, 样品溶液最终定容体积, mL。

2 结果与分析

2.1 不确定度来源分析

根据测定过程,分别对西地那非测定结果有影响的

各种不确定分量来源进行评估,产生不确定度的主要来源有以下几个方面:

(1)重复性引入的不确定度:包含实验过程中未知影响因素和已知但无法确定的不确定分量,覆盖实验过程中所有的除上述已描述以外的影响因素。

(2)对照品溶液浓度引入的不确定度:对照品证书上给出的西地那非含量及校准引入的不确定度;对照品称量所带入的不确定度(天平误差和示值重复性);稀释过程中定容体积和移液体积(允差、温度效应等)所带入的不确定度。

(3)标准曲线拟合引入的不确定度:标准曲线拟合过程中引入的不确定度。

(4)样品溶液浓度引入的不确定度:样品称量所带入的不确定度(天平误差和示值重复性);样液定容体积及稀释过程引入的不确定度,包含允差、温度效应等。

2.2 不确定度分量评定

2.2.1 测量重复性的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{rep})$

重复测定引入的不确定度主要考虑 A 类不确定度。为获得可靠性较高的标准偏差,平行测量 6 份样品中西地那非的含量 x , 所得到的测量数据见表 2。此分量合并研究了各种随机因素。

表 2 重复性测量结果($n=6$)
Table 2 Results of sample repeatability ($n=6$)

| 序号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 含量 $x/(\mu\text{g/g})$ | 0.937 | 0.920 | 0.925 | 0.909 | 0.928 | 0.942 |
| 平均 $\bar{x}/(\mu\text{g/g})$ | 0.927 | | | | | |

根据贝塞尔公式(2), 单次测量结果的标准偏差为:

$$S(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

式中: x_i 为样品独立测试含量; \bar{x} 为样品测试的平均含量, n 为样品测试次数。代入公式(2)计算得 $S(x)=0.0119$ (其中 $n=6$)。由于平时实际检测样品时仅平行制备 2 份样品进行测定, 故测量重复性引入的标准不确定度为:

$$u(\text{rep}) = \frac{S(x)}{\sqrt{m}} = 0.00841 \text{ (其中 } m=2\text{)}。$$

由测量重复性引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\text{rep}) = \frac{u(\text{rep})}{x} = 0.00907。$$

2.2.2 西地那非对照品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_s)$

2.2.2.1 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P_s)$

由西地那非对照品证书可知, 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 $U=0.5\%$, 则引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(P_s) = \frac{0.5\%}{2 \times 99.9\%} = 0.00250。$$

2.2.2.2 对照品称量带来的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(W_s)$

用精确至 0.01 mg 的电子天平称取 10.84 mg 西地那非对照品, 检定证书给出的示值最大误差为 0.05 mg, 重复性 0.15 mg, 按矩形分布分别计算, 其相对标准不确定度为: 天平误差 $u_{\text{rel}}(m_1) = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times 10.84} = 0.00266$; 天平

示值重复性 $u_{\text{rel}}(m_2) = \frac{0.15}{\sqrt{3} \times 10.84} = 0.00799$; 2 次称量(减量法)引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(W_s) = \sqrt{2 \times (u_{\text{rel}}(m_1)^2 + u_{\text{rel}}(m_2)^2)} = 0.0119。$$

2.2.2.3 对照品溶液配制过程中引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_s)$

(1)对照品溶液配制过程中量具引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}})$

对照品溶液配制过程中使用了 10、100 mL 容量瓶(A 级)及 100~1000 μL 移液器, 依据计量检定规程^[15-16], 均有相应的允许偏差。按均匀分布(矩形分布)考虑, 按公式 $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}}) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3} \times V}$ 计算, 由此引入的相对标准不确定度见表 3。

表 3 对照品溶液配制过程中量具引入的不确定度
Table 3 Uncertainty introduced by instruments during the preparation of reference solution

| 序号 | 量具规格(使用次数) | 应用体积 | 最大允差 | 相对标准不确定度 |
|----|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---|
| 1 | 100 mL A 级量瓶(4 次) | 100 mL | ± 0.10 mL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}1})=0.000577$ |
| 2 | 10 mL A 级量瓶(4 次) | 10 mL | ± 0.020 mL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}2})=0.00115$ |
| 3 | 100~1000 μL 移液器(2 次) | 200 μL | ± 3.0 μL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}3})=0.00866$ |
| 4 | 100~1000 μL 移液器(3 次) | 500 μL | ± 5.0 μL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}4})=0.00577$ |
| 5 | 100~1000 μL 移液器(2 次) | 1000 μL | ± 10 μL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}5})=0.00577$ |

由表 3 数据合成的相对标准不确定度： $u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}})$ = 0.0180。

(2) 对照品溶液配制过程中温度变化引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}})$

对照品溶液配制过程中，环境的温度波动也会产生一定不确定度。实验过程中实验室温度保持在 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ ，液体的体积膨胀明显大于容量瓶的体积膨胀，因此只需考虑前者即可。水的体积膨胀系数为 $\alpha = 2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ，乙腈的体积膨胀系数为 $\alpha = 1.4 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ，则 50% 乙腈水的平均体积膨胀系数 $\alpha = 4.0 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ，假设温度影响引起的不确定度按矩形分布，按公式 $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}}) = \frac{\alpha \times \Delta T}{\sqrt{3}}$ 计算，由此引入的相对标准不确定度见表 4。

由表 4 数据合成的相对标准不确定度： $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}})$ = 0.0124。

(3) 对照品溶液配制过程中引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_s)$ 合成为：

$$u_{\text{rel}}(V_s) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_{\text{校准}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}})^2} = 0.0219。$$

(4) 合成西地那非对照品溶液浓度的相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(C_s) = \sqrt{u_{\text{rel}}(P_s)^2 + u_{\text{rel}}(W_s)^2 + u_{\text{rel}}(V_s)^2} = 0.0250。$$

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

分别取对照品系列溶液 10 μL 注入高效液相色谱-串联质谱仪进行测定，仪器拟合的线性方程为 $y = 1.24 \times 10^4 x - 3.05 \times 10^4$ ，相关系数 $r = 0.99995$ 。则由标准曲线拟合引入的标准不确定度为：

$$u(\text{curve}) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x}_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

式中： S 为对照品溶液响应信号残差的标准差，计算方法为：

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)]^2} = 2.74 \times 10^4。$$

其中 $b = 1.24 \times 10^4$ ，为回归方程斜率； $p = 6$ ，为试样中待测物质含量的测定次数； $n = 6$ ，为对照品溶液的测定次数；通过实验测得样品的平均含量为 0.927 $\mu\text{g/g}$ ，设定取样量为 1.0 g，最终定容体积为 2500 mL，则待测物浓度的平均值 $\bar{x}_0 = 370.8 \text{ } \mu\text{g/L}$ ；对照品溶液的平均浓度 $\bar{x} = 168.8 \text{ } \mu\text{g/L}$ ； x_i 为由标准曲线方程得出的对照品溶液浓度； y_i 为相对于 x_i 的测定值。

代入公式(3)，则可计算出 $u(\text{curve}) = 1.604$ ，相关量值计算结果见表 5。

则由标准曲线拟合引入的相对标准不确定度为

$$u_{\text{rel}}(\text{curve}) = \frac{u(\text{curve})}{\bar{x}} = 0.00950。$$

表 4 对照品溶液配制过程中温度引入的不确定度

Table 4 Uncertainty introduced by temperature during the preparation of reference solution

| 序号 | 量具规格(使用次数) | 体积膨胀系数 $\alpha/^\circ\text{C}^{-1}$ | 应用体积 | 相对标准不确定度 |
|----|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------|--|
| 1 | 100 mL A 级量瓶(1 次) | 1.4×10^{-3} | 100 mL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}1}) = 0.00404$ |
| 2 | 100 mL A 级量瓶(3 次) | 4.0×10^{-4} | 100 mL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}2}) = 0.00115$ |
| 3 | 10 mL A 级量瓶(1 次) | 1.4×10^{-3} | 10 mL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}3}) = 0.00404$ |
| 4 | 10 mL A 级量瓶(3 次) | 4.0×10^{-4} | 10 mL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}4}) = 0.00115$ |
| 5 | 100~1000 μL 移液器(2 次) | 1.4×10^{-3} | 200 μL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}5}) = 0.00404$ |
| 6 | 100~1000 μL 移液器(3 次) | 1.4×10^{-3} | 500 μL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}6}) = 0.00404$ |
| 7 | 100~1000 μL 移液器(2 次) | 1.4×10^{-3} | 1000 μL | $u_{\text{rel}}(V_{\text{温度}7}) = 0.00404$ |

表 5 标准曲线拟合计算结果

Table 5 Results of standard curve fitting

| 序号 | x_i | y_i | $y = a + bx$ | $(y_i - y)^2$ | $(x_i - \bar{x})^2$ |
|-----|--------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 12.90 | 1.29×10^5 | 1.03×10^5 | 6.52×10^8 | 2.43×10^4 |
| 2 | 27.43 | 3.08×10^5 | 3.04×10^5 | 1.88×10^7 | 2.00×10^4 |
| 3 | 53.70 | 6.33×10^5 | 6.39×10^5 | 3.14×10^7 | 1.32×10^4 |
| 4 | 104.8 | 1.26×10^6 | 1.31×10^6 | 1.86×10^9 | 4.09×10^3 |
| 5 | 272.5 | 3.34×10^6 | 3.32×10^6 | 4.37×10^8 | 1.08×10^4 |
| 6 | 541.3 | 6.66×10^6 | 6.66×10^6 | 3.96×10^6 | 1.39×10^5 |
| 总和 | 1012.7 | 1.23×10^7 | 1.23×10^7 | 3.01×10^9 | 2.11×10^5 |
| 平均值 | 168.8 | 2.05×10^6 | 2.05×10^6 | 5.01×10^8 | 3.52×10^4 |

2.2.4 样品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_t)$ 2.2.4.1 样品质量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_t)$

用准确至 0.1 mg 的电子天平称取约 1.0 g 样品, 检定证书给出的示值最大误差为 0.5 mg(即 0.0005 g), 重复性 1.0 mg(即 0.0010 g), 按矩形分布分别计算, 其相对标准不确定度为: 天平误差 $u_{rel}(w_1) = \frac{0.0005}{\sqrt{3} \times 1.0} = 0.000289$;

天平示值重复性 $u_{rel}(w_2) = \frac{0.0010}{\sqrt{3} \times 1.0} = 0.000577$; 2 次称量(减量法)引入的相对标准不确定度为: $u_{rel}(W_t) = \sqrt{2 \times (u_{rel}(w_1)^2 + u_{rel}(w_2)^2)} = 0.000913$ 。

2.2.4.2 样品溶液稀释过程中引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_t)$

根据 1.2.2 样品溶液的制备所述, 分别考虑过程中由量具体积校准和温度引入的不确定度, 按矩形分布计算。

(1)用乙腈提取样品溶液时引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{t1})$

50 mL A 级量瓶最大允差 ΔV 为 ± 0.05 mL, 则校准引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{t1 \text{ 校准}}) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3} \times V} = 0.000577$; 乙腈的体积膨胀系数为 $\alpha = 1.4 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 则温度引入的相对标准不确定度为: $u_{rel}(V_{t1 \text{ 温度}}) = \frac{\alpha \times \Delta t}{\sqrt{3}} = 0.00404$ 。

合成相对标准不确定度: $u_{rel}(V_{t1}) = \sqrt{u_{rel}(V_{t1 \text{ 校准}})^2 + u_{rel}(V_{t1 \text{ 温度}})^2} = 0.00408$ 。

(2)用 50% 乙腈稀释样品溶液时引入的不确定度 $u_{rel}(V_{t2})$

50 mL A 级量瓶最大允差 ΔV 为 ± 0.05 mL, 则校准引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{t2 \text{ 校准}}) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3} \times V} = 0.000577$; 50% 乙腈水的平均体积膨胀系数 $\alpha = 4.0 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 则温度引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{t2 \text{ 温度}}) = \frac{\alpha \times \Delta t}{\sqrt{3}} = 0.00115$ 。

合成相对标准不确定度: $u_{rel}(V_{t2}) = \sqrt{u_{rel}(V_{t2 \text{ 校准}})^2 + u_{rel}(V_{t2 \text{ 温度}})^2} = 0.00129$ 。

(3)移取 1.0 mL 样品提取液引入的不确定度 $u_{rel}(V_{t3})$

移取 1 mL 体积最大允差 ΔV 为 ± 0.01 mL, 则校准引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{t3 \text{ 校准}}) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3} \times V} = 0.00577$; 乙腈的体积膨胀系数为 $\alpha = 1.4 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 温度引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_{t3 \text{ 温度}}) = \frac{\alpha \times \Delta t}{\sqrt{3}} = 0.00404$ 。

合成相对标准不确定度: $u_{rel}(V_{t3}) = \sqrt{u_{rel}(V_{t3 \text{ 校准}})^2 + u_{rel}(V_{t3 \text{ 温度}})^2} = 0.00704$ 。

(4)样品溶液稀释过程中引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_t) = \sqrt{u_{rel}(V_{t1})^2 + u_{rel}(V_{t2})^2 + u_{rel}(V_{t3})^2} = 0.00824。$$

2.2.4.3 合成样品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_t)$ 为:

$$u_{rel}(C_t) = \sqrt{u_{rel}^2(W_t) + u_{rel}^2(V_t)} = 0.00829。$$

2.3 合成标准不确定度的计算

各分量相对标准不确定度见表 6。

表 6 不确定度分量表

Table 6 Relative standard uncertainty of each component

| 分量 | 不确定度来源 | 类型 | 不确定度 |
|------------------|---------------|-----|---------|
| $u_{rel}(rep)$ | 重复性(各种随机因素) | A 类 | 0.00907 |
| $u_{rel}(C_s)$ | 对照品溶液的不确定度 | B 类 | 0.0250 |
| $u_{rel}(curve)$ | 标准曲线拟合引入的不确定度 | A 类 | 0.00950 |
| $u_{rel}(C_t)$ | 样品溶液的不确定度 | B 类 | 0.00829 |

合成相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}(rep)^2 + u_{rel}(C_t)^2 + u_{rel}(curve)^2 + u_{rel}(C_t)^2} = 0.029。$$

通过实验测得样品的平均含量 X 为 0.927 $\mu\text{g/g}$, 因此合成标准不确定度为:

$$u(X) = X \times u_{rel}(X) = 0.03 \mu\text{g/g}。$$

2.4 扩展不确定度的计算

取置信水平 $P=95\%$, 包含因子 $k=2$, 则扩展不确定度 $u(X) = k \times u(X) = 0.06 \mu\text{g/g}$ 。

用液相色谱-串联质谱法测定补肾壮阳类保健食品中西地那非的含量, 当取样量为 1.0 g, $k=2$ (置信水平 95%)时, 测得样品中西地那非含量为 $(0.927 \pm 0.06) \mu\text{g/g}$ 。

3 结论与讨论

本研究对抗疲劳类保健食品中西地那非的检测过程进行了不确定度分析, 发现影响检测结果的不确定因素包含测量重复性、天平称量、标准溶液的制备、样品溶液的制备、标准曲线拟合等, 其中对照品溶液制备过程中量器具对不确定度的影响最大。对于这些不确定度的影响, 可以通过调整仪器的性能、增加标准溶液的浓度点, 优化前处理过程等, 降低以上不确定度在实际检测样品中的不确定度占比, 提高测量结果的可信度。

参考文献

- [1] 符江, 荆文光, 章军, 等. 中药中非法添加问题研究现状与分析[J]. 中草药, 2014, 45(3): 437-442.
- FU J, JING WG, ZHANG J, et al. Research status and analysis of illegal addition in Chinese materia media preparations [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2014, 45(3): 437-442.
- [2] 孙鑫贵, 李春雨, 赵榕. 保健食品违法添加药物状况及管理对策[J].

- 首都公共卫生, 2010, 4(4): 153–155.
- SUN XG, LI CY, ZHAO R. Illegal addition of drugs in dietary supplements and its management strategy in China [J]. *Cap J Pub Health*, 2010, 4(4): 153–155.
- [3] 余庆斌, 徐玲, 肖志梅. 保健食品中违法添加药物的安全性分析[J]. *医药导报*, 2012, 31(7): 959–961.
- YU QB, XU L, XIAO ZM. Safety analysis of illegally added drugs in health food [J]. *Herb Med*, 2012, 31(7): 959–961.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2009030 补肾壮阳类中成药 [EB/OL]. [2009-12-07]. <https://max.book118.com/html/2019/03/12/5010212202002020.shtm>
- State Food and Drug Administration. Approval of supplementary test methods and test items for drug inspection 2009030- Chinese medicine with kidney impotence effect [EB/OL]. [2009-12-07]. <https://max.book118.com/html/2019/03/12/5010212202002020.shtm>
- [5] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2008016 具有补肾壮阳功效的中成药 [EB/OL]. [2008-12-15]. <https://wenku.baidu.com/view/6b765b9229ea81c758f5f61fb7360b4c2f3f2a6b>
- State Food and Drug Administration. The approved compensation process and inspecting item of China food and drug administration-Serial number 2008016-Chinese medicine with kidney impotence effect [Z]. [2008-12-15]. <https://wenku.baidu.com/view/6b765b9229ea81c758f5f61fb7360b4c2f3f2a6b>
- [6] 蒋丽萍, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS 法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的 9 种壮阳类化学药物 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2238–2245.
- JIANG LP, TU JH, XU HX, *et al.* Determination of nine chemicals illegally added into antifatigue health foods by UPLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2015, 46(15): 2238–2245.
- [7] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 补肾壮阳类药品中非法添加化学药物检测技术的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(5): 677–680.
- XU S, JIN PF, XU WF, *et al.* Research advances on analytical technologies of illegally adulterated chemical substances in medicines for invigorants [J]. *Northwest Pharm J*, 2017, 32(5): 677–680.
- [8] 吴燕, 李华龙, 米亚娟, 等. 中药及保健食品中新型 PDE₅ 抑制剂的检测研究[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 117–121.
- WU Y, LI HL, MI YX, *et al.* Study on the detection of new PDE₅ inhibitor in traditional Chinese medicine and health food [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 117–121.
- [9] 李可, 郭常川, 石峰, 等. 补肾壮阳类中成药和保健品中添加 5 型磷酸二酯酶(PDE₅)抑制剂及其类似物检测方法研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(4): 566–574.
- LI K, GUO CC, SHI F, *et al.* Research progress in determination technologies for adulterated phosphodiesterase-5(PDE-5) inhibitors and their analogue in invigorant herbal medicines and dietary supplements [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(4): 566–574.
- [10] 陈东洋, 张昊, 冯家力, 等. 保健食品中违禁药物检验技术研究进展[J]. *色谱*, 2020, 38(8): 888–890.
- CHEN DY, ZHANG H, FENG JL, *et al.* Advances in technologies for determination of illegal drugs in health food [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, 38(8): 888–890.
- [11] 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 quantifying uncertainty in chemical analysis [S].
- [12] 谢柏艳, 覃娟, 杨玉平. 液质联用法检测保健食品中非法添加的 13 种 5 型磷酸二酯酶抑制剂 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(13): 1542–1545.
- XIE BY, QIN J, YANG YP. Determination of 13 PDE-5 inhibitors illegally added in dietary supplement of aphrodisiacs by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2020, 30(13): 1542–1545.
- [13] JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示[S].
- JJF 1059.1—2012 Evaluation and expression of measurement uncertainty [S].
- [14] JJF 1135—2005 化学分析测量不确定度评定[S].
- JJF 1135—2005 Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement [S].
- [15] GB/T 12806—2011 实验室玻璃仪器 单标线容量瓶[S].
- GB/T 12806—2011 Laboratory glassware-One-mark volumetric flasks [S].
- [16] JJG 646—2006 移液器检定规程[S].
- JJG 646—2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



谢柏艳, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 181094873@qq.com



杨玉平, 硕士, 工程师, 主要研究方向为理化检验。
E-mail: 280731104@qq.com