

# 高效液相色谱-串联质谱法测定鱼粉中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留量的不确定度评估

许莺婷<sup>1\*</sup>, 王伟影<sup>2</sup>, 颜伟华<sup>1</sup>

(1. 衢州市食品药品检验研究院, 衢州 324000; 2. 丽水市质量检验检测研究院, 丽水 323000)

**摘要:** **目的** 评定高效液相色谱-串联质谱法测定鱼粉中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星药物残留量的不确定度。**方法** 依据 GB/T 21312—2007《动物源性食品中 14 种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》, 建立数学模型, 计算各来源对其检测的不确定度影响, 从而得出合成不确定度和扩展不确定度。**结果** 当鱼粉中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留量为 341.91、28.06、27.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时, 其扩展不确定度分别为 38.84、5.03、3.42  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $P=95\%$ ,  $k=2$ )。**结论** 影响检测结果的不确定度主要来源于标准曲线拟合、标准溶液配制和样品回收率。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 鱼粉; 诺氟沙星; 环丙沙星; 恩诺沙星; 不确定度

## Uncertainty evaluation for the determination of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in fish meal by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Ying-Ting<sup>1\*</sup>, WANG Wei-Ying<sup>2</sup>, YAN Wei-Hua<sup>1</sup>

(1. Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324000, China; 2. Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in fish meal by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** According to GB/T 21312—2007 *Analysis of fourteen quinolones in food of animal origin-High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method*, by establishing a mathematical model, the sources of uncertainty were analyzed and the effects of different sources were measured and calculated. **Results** When the residues of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in fish meal were 341.91, 28.06 and 27.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , the expanded uncertainties were 38.84, 5.03 and 3.42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively ( $P=95\%$ ,  $k=2$ ). **Conclusion** The uncertainties of the experiments are mainly derived from the calibration curve fitting, standard solution preparation process and the recovery rate.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fish meal; norfloxacin;

**基金项目:** 浙江省衢州市重点实验室项目(衢市科发高[2015]8号)、衢州市专家工作站项目(衢委人才[2018]4号)、“衢六味”品牌标准化试点项目(衢市监标准[2019]15号)

**Fund:** Supported by the Zhejiang Quzhou City Key Laboratory Project (No.[2015]8), Quzhou City Experts Workstation Project (No. [2018] 4), and the Qu Six Flavors Brand Standardization Pilot Projects (No.[2019]15)

\*通信作者: 许莺婷, 主管药师, 主要研究方向为食品药品检测与质量管理。E-mail: 25434569@qq.com

\*Corresponding author: XU Ying-Ting, Pharmacist, Quzhou Institute for Food and Drug Control, No.339, Hesi Road, Kecheng District, Quzhou 324000, China. E-mail: 25434569@qq.com

ciprofloxacin; enrofloxacin; uncertainty

## 0 引言

诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星均属于第三代喹诺酮类药物,在鱼病防治中主要用于治疗由细菌引起的肠炎病、爱德华氏菌病等疾病<sup>[1]</sup>。随着该类药物的广泛使用,喹诺酮类药物在动物源性食物中的残留问题已经引起大众的高度关注。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》<sup>[2]</sup>对诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星在动物中的最高残留量有明确的规定。完整的检测结果应包含测量值及其不确定度,根据国家标准 GB/T 27025—2019《检验和校准实验室能力的通用要求》<sup>[3]</sup>,认证认可实验室应具有评定测量不确定度的相关程序,检测报告中应包含有不确定度的信息。因此,本研究参照 CNAS-GL006—2019《化学分析中不确定度的评估指南》<sup>[4]</sup>和 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》<sup>[5]</sup>,依据 GB/T 21312—2007《动物源性食品中14种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》<sup>[6]</sup>,对鱼粉中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留量的不确定度来源进行分析和量化,以期为实验室的质量控制提供科学依据,同时为测量其他药物残留量的不确定度分析提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料

诺氟沙星标准品(CAS: 70458-96-7,含量99.5%,批号: 130450-201206)、恩诺沙星标准品(CAS: 93106-60-6,含量100%,批号 510117-201501)、环丙沙星标准品(CAS: 85721-33-1,含量 84.2%,批号 130451-201203)(中国食品药品检验研究院);甲醇、甲酸、乙腈、正己烷(色谱纯,上海安谱科技股份有限公司);乙二胺四乙酸二钠(分析纯,浙江临安青山化工试剂厂);一水柠檬酸(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水磷酸氢二钠(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);水为自制超纯水。

阳性鱼粉样品:实验室制备。

#### 1.1.2 仪器

LCMS-8040 三重四极杆串联质谱仪(日本 Shimadzu 公司); Labsolutions 软件(日本 Shimadzu 公司); XP-205 电子天平(瑞士 Mettler 公司); SK5200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); ASE-24 固相萃取仪(天津奥特赛思仪器有限公司); Oasis HLB 固相萃取柱(美国 Waters 公司); VORTEX3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); ST8 高速离心机(美国 Thermo fisher Scientific 公司); EFAA-PC-24-RT 氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司); Transferpette®S 手

动移液器(德国 Brand 公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品前处理

称取均质鱼粉 1.0 g,加入 5.0 mL 水复溶,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 0.1 mol/mL 的 EDTA McIlvaine 缓冲溶液,8000 r/min 涡旋混合 1 min,超声提取 10 min,8000 r/min 离心 5 min(温度 4 °C),提取 3 次,过 0.22 μm 有机相滤膜后上机。

#### 1.2.2 标准工作曲线的配制

(1)诺氟沙星储备液的配制:精密称取诺氟沙星 0.10290 g,用甲醇定容至 200.0 mL,制备成浓度为 0.5119 mg/mL 的储备液。

(2)恩诺沙星储备液的配制:精密称取恩诺沙星 0.01341 g,用甲醇定容至 100.0 mL,制备成浓度为 0.1341 mg/mL 的储备液。

(3)环丙沙星储备液的配制:精密称取环丙沙星 0.12041 g,用甲醇定容至 100.0 mL,制备成浓度为 1.0139 mg/mL 的储备液。以上储备液均于 1~4 °C 低温冰箱密封保存。

(4)取诺氟沙星储备液、环丙沙星储备液和恩诺沙星储备液各 0.490、0.247 和 1.865 mL,用甲醇定容至 25.00 mL 的标准中间液。精密吸取标准中间液 1 mL 和 100 μL,分别用初始流动相溶解并定容至 10.0 mL 容量瓶,分别配成浓度为 1000 ng/mL 和 100 ng/mL 的混合标准使用液。

(5)精密吸取 50、100、200 μL 的 100 ng/mL 的混合标准使用液及 75、100 μL 的 1000 ng/mL 的混合标准使用液加入空白基质鱼粉中,配制成浓度为 5、10、20、75、100 ng/mL 混合标准工作液,以标准工作液的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

#### 1.2.3 仪器条件

##### (1)色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus-C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),柱温: 40 °C,进样体积: 1 μL。流动相: 0.2%甲酸(A相),甲醇(B相),流速: 0.2 mL/min,梯度洗脱,见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient program of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	90	10
1.00	90	10
5.00	70	30
7.00	50	50
8.00	10	90
8.10	90	10
12.00	90	10

(2)质谱条件

电离源: 电喷雾离子源正离子 (electron spray ionization, ESI+); 毛细管电压: 3.5 kV; 脱溶剂气温度: 250 °C; 加热块温度: 400 °C; 干燥气流速: 15 L/min; 雾化气流速: 3 L/min; 检测离子: 正离子; 扫描模式: 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 见表 2。

表 2 3 种化合物定量离子、定性离子和碰撞能量  
Table 2 MS spectra parameters for 3 chemical compounds

化合物	电离方式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/V
诺氟沙星	ESI+	320.20	302.1*/231.1	20/46
环丙沙星	ESI+	332.20	314.1/231.0*	16/44
恩诺沙星	ESI+	360.3	342.2*/316.2	20/20

注: \*为定量离子

1.2.4 不确定度数学模型的建立

样品溶液中各组分含量的计算公式(1):

$$X = \frac{C \times V \times F}{m} \quad (1)$$

式(1)中 X 为待测组分含量, μg/kg; C 为从标准曲线查得待测组分的浓度, ng/mL; V 为定容体积, mL(V=1); m 为样品称样量, g; F 为稀释倍数(F=10)。

2 结果与分析

2.1 样品前处理过程中引入的相对标准不确定度  $U_{rel1}$

2.1.1 样品称量引入的相对标准不确定度  $U_{rel1.1}$

本次测定的样品为粉末状, 试样均匀, 因此样品不均匀性产生的不确定度忽略不计。根据 JJG 539—2016《数字标示称》<sup>[7]</sup>规定, 天平 0~5 g 称量范围内最大允许误差为 ±0.05 mg; 且实验过程中使用的 Mettler XP-205 电子天平, 其准确度等级为 1 级, 检定证书提供的最大允许误差为 ±0.05 mg, 按矩形分布, 取  $k = \sqrt{3}$ , 则  $U_{(1.1)} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289$  mg。称量样为 1 g, 相对标准不确定度为:  $U_{rel1.1} = U_{(1.1)}/m = 2.89 \times 10^{-5}$ 。

2.1.2 样品定容体积引入的相对标准不确定度  $U_{rel1.2}$

称取均质鱼粉 1.0 g, 按 1.2.1 法提取后用甲醇定容至 1 mL 容量瓶, 引入的相对标准不确定度按 B 类进行评定。根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》<sup>[8]</sup>规定, 20 °C 时 1 mL A 级容量瓶的容量允差为 ±0.01 mL, 按矩形分布, 取  $k = \sqrt{3}$ , 则容量瓶容量允差产生的标准不确定度  $U_{1(1.2)} = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 5.774 \times 10^{-3}$  mL; 已知甲醇的膨胀系数为  $1.1 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , 实验室的温度为 (20±5) °C, 按 95% 的置信概率 ( $k=1.96$ ), 由温度产生的标准不确定度为  $U_{2(1.2)} = \frac{1 \times 1.1 \times 10^{-3} \times 5}{1.96} = 2.806 \times 10^{-3}$  mL。则由 1 mL 容量瓶

定容产生的相对标准不确定度:  $U_{rel(1.2)}$

$$= \frac{\sqrt{(5.774 \times 10^{-3})^2 + (2.806 \times 10^{-3})^2}}{1} = 6.42 \times 10^{-3}$$

合成以上相对标准不确定度, 则

$$U_{rel1} = \sqrt{U_{rel1.1}^2 + U_{rel1.2}^2} = \sqrt{(2.89 \times 10^{-5})^2 + (6.42 \times 10^{-3})^2} = 6.42 \times 10^{-3}$$

2.2 标准系列溶液配制过程中引入的相对标准不确定度  $U_{rel2}$

根据  $U_{rel2} = \sqrt{U_{rel2.1}^2 + U_{rel2.2}^2}$  得出标准系列溶液配制过程中引入的相对标准不确定度, 其中  $U_{rel2.1}$  为标准品称量引入的不确定度,  $U_{rel2.2}$  为标准溶液稀释过程中引入的相对标准不确定度。

2.2.1 标准品称量引入的不确定度  $U_{rel2.1}$

以诺氟沙星为例, 采用 B 类方法评定, 根据 JJG 539—2016《数字标示称》规定, 天平 0~5 g 称量范围内最大允许误差为 ±0.05 mg; 且实验过程中使用的 Mettler XP-205 电子天平, 其准确度等级为 1 级, 检定证书提供的最大允许误差为 ±0.05 mg, 按照矩形分布, 取  $k = \sqrt{3}$ , 则

$$U_{(2.1\text{诺})} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289 \text{ mg}。 U_{rel(2.1\text{诺})} = \frac{U_{(2.1\text{诺})}}{m} = 0.0289/102.90 = 2.81 \times 10^{-4}$$

同法计算, 得:  $U_{rel(2.1\text{环})} = U_{(2.1\text{环})}/m = 0.0289/120.41 = 2.40 \times 10^{-4}$ 。

$$U_{rel(2.1\text{恩})} = U_{rel(2.1\text{恩})}/m = 0.0289/13.41 = 2.155 \times 10^{-3}$$

2.2.2 标准溶液稀释过程中引入的相对标准不确定度  $U_{rel2.2}$

以 1000 ng/mL 和 100 ng/mL 的混合标准使用液配制成不同浓度的混合标准工作液, 采用不同量程的移液器和 A 级容量瓶完成稀释, 引入的相对标准不确定度按 B 类进行评定。

以 200 mL 容量瓶为例, 根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》规定, 20 °C 时 200 mL A 级容量瓶的容量允差为 ±0.15 mL, 按矩形分布, 取  $k = \sqrt{3}$ , 则容量瓶容量允差产生的标准不确定度  $U_{1(2.2)} = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 0.0866$  mL; 已知甲醇的膨胀系数为  $1.1 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , 实验室的温度为 (20±5) °C, 按 95% 的置信概率 ( $k=1.96$ ), 由温度产生的标准不确定度为:

$$U_{2(2.2)} = \frac{200 \times 1.1 \times 10^{-3} \times 5}{1.96} = 0.5612 \text{ mL}。 则由 200 \text{ mL}$$

容量瓶定容产生的标准不确定度:  $U_{(2.2)} = \sqrt{U_{1(2.2)}^2 + U_{2(2.2)}^2} = \sqrt{0.08661^2 + 0.56122^2} = 0.56786$  mL。则由标准储备液定容引入的相对不确定度为:

$$U_{rel(2.2)} = \frac{U_{(2.2)}}{V} = \frac{0.56786}{200} = 0.002839。 各容量瓶的相对标准$$

不确定度见表 3。

以 20~200  $\mu\text{L}$ (200  $\mu\text{L}$ ) 移液器为例, 根据 JJG 646—2006《移液器检定规程》规定, 20~200  $\mu\text{L}$  移液器在移取 100  $\mu\text{L}$  时最大容量允差为 $\pm 100 \times 2.0\%$ , 按矩形分布, 取  $k = \sqrt{3}$ , 则 20~200  $\mu\text{L}$  移液器(100  $\mu\text{L}$ )容量允差产生的标准不确定度为 1.155  $\mu\text{L}$ ; 已知甲醇的膨胀系数为  $1.1 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , 实验室的温度为(20 $\pm$ 5)  $^\circ\text{C}$ , 按 95%的置信概率( $k=1.96$ ), 由温度产生的标准不确定度为 0.2806  $\mu\text{L}$ 。则由 20~200  $\mu\text{L}$  移液器(100  $\mu\text{L}$ )产生的相对标准不确定度为  $1.189 \times 10^{-2}$ 。各移液枪不同体积的相对标准不确定度见表 4。

标准系列溶液配制引入的相对标准不确定度  $U_{\text{rel}2.2}$  以诺氟沙星为例, 根据配制过程中实际量取的溶液体积

来选择容量瓶和移液器的量程, 从而计算引入的不确定度, 则  $U_{\text{诺rel}2.2} = 0.0288$ ,  $U_{\text{诺rel}2} = \sqrt{U_{\text{诺rel}2.1}^2 + U_{\text{诺rel}2.2}^2} = \sqrt{(2.81 \times 10^{-4})^2 + 0.0288^2} = 0.0288$ 。具体配制过程中所需器皿的使用次数和各化合物的标准系列溶液配制引入的相对标准不确定度结果见表 5。

### 2.3 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $U_{\text{rel}3}$

标准曲线采用最小二乘法进行拟合, 用在线测定标准系列溶液的 5 个点, 各化合物标准系列溶液的质量浓度、峰面积见表 6, 得到的线性回归方程和相关系数见表 7。

表 3 各容量瓶的相对标准不确定度  
Table 3 Relative uncertainty introduced by each volumetric flask

项目	200 mL 容量瓶	100 mL 容量瓶	25 mL 容量瓶	10 mL 容量瓶	1 mL 容量瓶
最大允差 V/mL	$\pm 0.15$	$\pm 0.10$	$\pm 0.03$	$\pm 0.020$	$\pm 0.010$
量器体积的准确性引入的标准不确定度/mL(按矩形分布, 取 $k = \sqrt{3}$ )	0.0866	0.0577	0.0173	0.0116	$5.774 \times 10^{-3}$
温度不同引入的标准不确定度/mL [甲醇的膨胀系数为 $1.1 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , 实验室的温度为(20 $\pm$ 5) $^\circ\text{C}$ , 按 95%的置信概率( $k=1.96$ )]	0.5612	0.2806	0.0702	0.0281	0.0028
各量器的相对标准不确定度	$2.839 \times 10^{-3}$	$2.865 \times 10^{-3}$	$2.890 \times 10^{-3}$	$3.034 \times 10^{-3}$	$6.420 \times 10^{-3}$

表 4 各移液枪不同体积的相对标准不确定度  
Table 4 Relative uncertainty introduced by each pipette with different volumes

项目	100~1000 $\mu\text{L}$ 移液器 (100 $\mu\text{L}$ )	100~1000 $\mu\text{L}$ 移液器 (500 $\mu\text{L}$ )	100~1000 $\mu\text{L}$ 移液器 (1000 $\mu\text{L}$ )	20~200 $\mu\text{L}$ 移液器 (20 $\mu\text{L}$ )	20~200 $\mu\text{L}$ 移液器 (100 $\mu\text{L}$ )	20~200 $\mu\text{L}$ 移液器 (200 $\mu\text{L}$ )
不同体积的最大允差 V/ $\mu\text{L}$	$\pm 100 \times 2.0\%$	$\pm 500 \times 1.0\%$	$\pm 1000 \times 1.0\%$	$\pm 20 \times 4.0\%$	$\pm 100 \times 2.0\%$	$\pm 200 \times 1.5\%$
不同体积的准确性引入的标准不确定度/ $\mu\text{L}$ (按矩形分布, 取 $k = \sqrt{3}$ )	1.155	2.887	5.774	0.4619	1.155	1.732
温度不同引入的标准不确定度/ $\mu\text{L}$ [甲醇的膨胀系数为 $1.1 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , 实验室的温度为(20 $\pm$ 5) $^\circ\text{C}$ , 按 95%的置信概率( $k=1.96$ )]	0.2806	1.403	2.806	0.05612	0.2806	0.5612
各移液枪不同体积的相对标准不确定度	$1.189 \times 10^{-2}$	$6.420 \times 10^{-3}$	$6.420 \times 10^{-3}$	$2.326 \times 10^{-2}$	$1.189 \times 10^{-2}$	$9.103 \times 10^{-3}$

表 5 标准系列溶液配制引入的相对标准不确定度  
Table 5 Relative uncertainty introduced by standard solution preparation

名称	标准品称量引入的相对标准不确定度 $U_{\text{rel}2.1}$	标准系列溶液配制过程中所需的玻璃器皿	标准系列溶液配制引入的相对标准不确定度 $U_{\text{rel}2.2}$	$U_{\text{rel}2}$
诺氟沙星	$2.81 \times 10^{-4}$	200 mL 容量瓶 1 个、25 mL 容量瓶 1 个、10 mL 容量瓶 1 个、1 mL 容量瓶 1 个、100~1000 $\mu\text{L}$ 移液器(500 $\mu\text{L}$ )1 次、100~1000 $\mu\text{L}$ 移液器(1000 $\mu\text{L}$ )1 次、20~200 $\mu\text{L}$ 移液器(100 $\mu\text{L}$ )5 次、20~200 $\mu\text{L}$ 移液器(200 $\mu\text{L}$ )1 次	0.0288	0.0288

表 5(续)

名称	标准品称量引入的相对标准不确定度 $U_{rel2.1}$	标准系列溶液配制过程中所需的玻璃器皿	标准系列溶液配制引入的相对标准不确定度 $U_{rel2.2}$	$U_{rel2}$
环丙沙星	$2.40 \times 10^{-4}$	100 mL 容量瓶 1 个、25 mL 容量瓶 1 个、10 mL 容量瓶 1 个、1 mL 容量瓶 1 个、100~1000 $\mu$ L 移液器 (500 $\mu$ L)1 次、100~1000 $\mu$ L 移液器(1000 $\mu$ L)1 次、20~200 $\mu$ L 移液器(100 $\mu$ L)5 次、20~200 $\mu$ L 移液器 (200 $\mu$ L)1 次	0.0306	0.0306
恩诺沙星	$2.155 \times 10^{-3}$	100 mL 容量瓶 1 个、25 mL 容量瓶 1 个、10 mL 容量瓶 1 个、1 mL 容量瓶 1 个、100~1000 $\mu$ L 移液器 (1000 $\mu$ L)3 次、20~200 $\mu$ L 移液器(100 $\mu$ L)5 次、20~200 $\mu$ L 移液器(200 $\mu$ L)1 次	0.0313	0.0314

表 6 各化合物标准系列溶液的质量浓度与对应的峰面积  
Table 6 Mass concentration and area of each compound standard solution

化合物	标准溶液浓度/(ng/mL)	峰面积	化合物	标准溶液浓度/(ng/mL)	峰面积	化合物	标准溶液浓度/(ng/mL)	峰面积
	5.0166	39370		5.0087	13220		5.0019	10273
	10.0332	49959		10.0173	29967		10.0039	21181
诺氟沙星	20.0665	105755	环丙沙星	20.0347	68226	恩诺沙星	20.0077	53835
	75.2493	362895		75.1300	244409		75.0289	174874
	100.3324	510941		100.1733	364258		100.0386	241784

表 7 各化合物的线性方程和相关系数  
Table 7 Linear equation and correlation coefficient of each compound

化合物	线性方程	相关系数
诺氟沙星	$Y=4942.45X+6201.35$	0.9989
环丙沙星	$Y=3580.27X-6355.21$	0.9974
恩诺沙星	$Y=2394.55X-81.897$	0.9991

式中:  $S$  为拟合曲线的残差标准差,  $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - Y)^2}{n-2}}$ ;  $b$  为斜率;  $p$  为样品重复测定次数( $p=6$ );  $n$  为标准溶液的重复测定次数( $n=5$ );  $x$  为标准溶液各化合物浓度;  $c$  为各次重复测定样品中化合物浓度。以诺氟沙星为例,

$$x = \frac{\sum_{i=1}^n x_{\text{标}}}{n} = 42.1396 \text{ ng/mL}, c = 37.10 \text{ ng/mL}, \text{ 结合式(1)得}$$

$X=341.91 \text{ ug/kg}$ ; 根据残差标准差公式, 得  $S=11752.1916$ , 则诺氟沙星标准曲线拟合时引入的标准不确定度为  $U_{\text{fit}3} = 1.4466 \text{ ng/mL}$ , 相对标准不确定度  $U_{rel3} = 1.4466/37.10 = 0.0390$ 。标准工作曲线引入的不确定度计算的有关量值见表 8。

标准曲线拟合产生的相对标准不确定度为:

$$U_{rel3} = \frac{S}{cb} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(\bar{c}-x)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

表 8 标准工作曲线引入的不确定度计算的有关量值  
Table 8 Value of uncertainty introduced by standard working curve

化合物	$s$	$p$	$n$	$b$	$x$ /(ng/mL)	$c$ /(ng/mL)	$U_3$ /(ng/mL)	$U_{rel3}$	$X$ /( $\mu$ g/kg)
诺氟沙星	11752.1916	6	5	4942.45	42.1396	37.10	1.4466	0.0390	341.91
环丙沙星	12731.0730	6	5	3580.27	42.0728	28.07	2.2301	0.0794	28.06
恩诺沙星	4945.9694	6	5	2394.55	42.0162	27.35	1.2998	0.0475	27.25

## 2.4 测定重复性引入的相对标准不确定度 $U_{rel4}$

在 6 份约 1 g 空白鱼粉试样中添加 30  $\mu\text{L}$  的 100 ng/mL 的混合标准使用液, 按 1.2.3 方法测定, 测得结果见表 9。

表 9 样品重复性测量结果  
Table 9 Results of sample repeated measurement

测定次数	1	2	3	4	5	6
诺氟沙星含量/(ng/mL)	2.76	2.66	2.88	2.99	2.70	2.67
环丙沙星含量/(ng/mL)	2.64	2.70	2.93	2.77	2.59	2.71
恩诺沙星含量/(ng/mL)	2.66	2.61	2.79	2.88	2.69	2.59

根据含量平均值为:  $\bar{c} = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 c_i$  (式 2) 和标准偏差为:

$$S_{(c)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (c_i - \bar{c})^2}{6-1}} \quad (\text{式 3}), \text{ 求得相对标准不确定度为:}$$

$$U_{rel4} = \frac{S_{(c)}}{c \times \sqrt{6}}, \text{ 具体计算结果见表 10。}$$

表 10 重复性测量引入的相对不确定度评定  
Table 10 Uncertainty introduced by the results of repeated measurement

化合物	测定值均值 $\bar{c}$ /(ng/mL)	测定值标准 偏差 $S_{(c)}$	相对标准 不确定度 $U_{rel4}$
诺氟沙星	2.7748	0.1307	0.0192
环丙沙星	2.7188	0.1197	0.0180
恩诺沙星	2.7026	0.1107	0.0167

## 2.5 回收率引入的相对标准不确定度 $U_{rel5}$

在方法检出限 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  进行加标回收, 样品回收率见表 11。

表 11 样品回收率  
Table 11 Sample recovery rate

样品实验次数	1	2	3	4	5	6
诺氟沙星回收率/%	91.48	88.23	95.32	98.99	89.50	88.37
环丙沙星回收率/%	87.73	88.74	97.31	92.20	86.14	90.06
恩诺沙星回收率/%	88.71	86.88	92.94	95.81	89.56	86.26

表 13 各化合物的合成相对不确定度  
Table 13 Uncertainty of each compound

化合物	$U_{rel1}$	$U_{rel2}$	$U_{rel3}$	$U_{rel4}$	$U_{rel5}$	$U_{rel6}$	$U_{rel}$
诺氟沙星	$6.42 \times 10^{-3}$	0.0288	0.0390	0.0192	0.0192	0.010	0.0568
环丙沙星	$6.42 \times 10^{-3}$	0.0306	0.0794	0.01797	0.0180	0.010	0.0896
恩诺沙星	$6.42 \times 10^{-3}$	0.0314	0.0475	0.01672	0.0167	0.010	0.0628

根据表 11 可知各化合物的平均回收率  $\bar{R} = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 R_i$ ,

则标准偏差为:  $S_{(R)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (R_i - \bar{R})^2}{6-1}}$ , 计算得各化合物的

标准偏差和相对标准不确定度  $U_{rel5} = \frac{S_{(R)}}{R \times \sqrt{6}}$ , 各计算结果见表 12。

表 12 回收率引入的相对标准不确定度  
Table 12 Uncertainty introduced by the sample recovery rate

化合物	加入量 /(ng/mL)	回收率均值 /%	$S$	$U_5$	$U_{rel5}$
诺氟沙星	3.0166	91.98	0.0433	0.0177	0.0192
环丙沙星	3.0087	90.36	0.0398	0.0162	0.0177
恩诺沙星	3.0019	90.03	0.0369	0.0150	0.0167

## 2.6 仪器量化相对标准不确定度 $U_{rel6}$

LCMS-8040 三重四极杆串联质谱仪(岛津公司)的校准证书提供的不确定度  $U_{rel}=2\%$ ,  $k=2$ , 按均匀分布, 其相对标准不确定度为  $U_{rel6}=U_{rel}/k=0.010$ 。

## 2.7 合成相对不确定度评定

以上各不确定度分量互不相关, 因此鱼粉中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星含量测定结果的合成相对不确定度为:

$$U_{rel} = \sqrt{U_{rel1}^2 + U_{rel2}^2 + U_{rel3}^2 + U_{rel4}^2 + U_{rel5}^2 + U_{rel6}^2}。$$

具体计算结果见表 13。

## 2.8 扩展不确定度评定

假定置信概率  $P$  为 95%, 取包含因子  $k=2$ , 以诺氟沙星为例,  $U = U_{rel} \times \bar{X} \times 2 = 0.0568 \times 341.91 \times 2 = 38.84 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 测定结果表示为:  $X_{诺} = (341.91 \pm 38.84) \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $P=95\%$ ,  $k=2$ )。则: 环丙沙星和恩诺沙星的测定结果分别表示为:  $X_{环} = (28.06 \pm 5.03) \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $P=95\%$ ,  $k=2$ ) 和  $X_{恩} = (27.25 \pm 3.42) \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $P=95\%$ ,  $k=2$ )。

## 2.9 不确定度来源分析

根据检测方法和数学模型, 不确定度分量主要来源<sup>[9-16]</sup>: 样品称量引入的相对标准不确定度; 样品定容体积引入的相对标准不确定度; 标准品称量引入的不确定度; 标准溶液稀释过程中引入的相对标准不确定度; 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度; 样品测定重复性引入的不确定度; 回收率引入的相对标准不确定度; 仪器量化相对标准不确定度。

## 3 结论与讨论

本研究通过对样品称量、样品定容、标准品称量、标准系列溶液配制过程、标准曲线拟合、样品测定重复性、回收率和仪器量化等因素的考虑, 计算了诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的不确定度, 发现标准曲线的拟合和配制过程中产生的不确定度最大, 其次是回收率产生的不确定度。因此, 在实际工作中, 需要提升检测人员的操作规范性和稳定性, 严格标准溶液的逐级稀释过程, 熟悉检测方法从而减小结果的不确定度, 提高检测结果的准确性。

## 参考文献

- [1] 周洲, 蒋晓红, 张龙涛, 等. 喹诺酮类抗菌药物在水产养殖中的应用进展[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(8): 161-164.  
ZHOU Z, JIANG XH, ZHANG LT, *et al.* Advances on applied research of quinolones antibacterial drugs in aquaculture [J]. Guizhou Agric Sci, 2012, 40(8): 161-164.
- [2] 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].
- [3] GB/T 27025—2019 检验和校准实验室能力的通用要求[S].  
GB/T 27025—2019 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [4] 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].
- [5] 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].
- [6] GB/T 21312—2007 动物源性食品中14种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S].  
GB/T 21312—2007 Analysis of fourteen quinolones in food of animal origin by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [S].
- [7] JJG 539—2016 数字标示称[S].  
JJG 539—2016 Digital indicating weighing instruments [S].
- [8] JJG 196—2006 常用玻璃量器检定规程[S].  
JJG 196—2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [9] 刘真, 王玉梅. 液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中氟甲砜霉素的相对标准不确定度评估报告[J]. 现代食品, 2020, 8: 176-179, 184  
LIU Z, WANG YM. Uncertainty report on determination of florfenicol residues in fish by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Mod Food, 2020, 8: 176-179, 184.

- [10] 陈梦, 卢光英, 王伟影, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定红酒中安赛蜜含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1611-1615  
CHEN M, LU GY, WANG WY, *et al.* Uncertainty evaluation for the determination of acesulfame in red wine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(5): 1611-1615
- [11] 刘锐, 高秀梅, 乔敏莎, 等. ICP-MS 法测定消渴清颗粒原料药材中15种重金属和有害元素及其不确定度评估[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4): 685-692.  
LIU R, GAO XM, QIAO MS, *et al.* Determination of fifteen heavy metals and harmful elements in raw materials of Xiaokeqing granules by ICP-MS and evaluation of the uncertainty [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(4): 685-692.
- [12] 何苏琴, 王笑笑, 徐宇昌, 等. 紫外-可见分光光度法测定枇杷蜜中总黄酮含量不确定度评定[J]. 医药导报, 2018, 2(37): 223-226.  
HE SQ, WANG XX, XU YC, *et al.* Evaluation of measurement uncertainty for the determination of flavonoids in loquat honey by UV spectrophotometry [J]. Herb Med, 2018, 2(37): 223-226.
- [13] 赵静, 王环, 臧秀珍, 等. 电感耦合等离子体发射光谱法测定饲料中8种元素含量的不确定度分析[J]. 饲料研究, 2021, 1, <https://doi.org/10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2021.01.023>  
ZHAO J, WANG H, GAO XZ, *et al.* Uncertainty analysis of measurement of eight elements in feed by inductively coupled plasma emission spectrometry [J]. Feed Res, 2021, 1, <https://doi.org/10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2021.01.023>
- [14] 张梅超, 慕金雨, 王妍, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定鱼肉中甲基汞、乙基汞含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 20(11): 7317-7321.  
ZHANG MC, MU JY, WANG Y, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of methyl mercury and ethyl mercury in fish by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 20(11): 7317-7321.
- [15] 张晓男, 魏惠珍, 金浩鑫, 等. HPLC 法测定杏仁配方颗粒中苦杏仁苷及其不确定度评价[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 1(31): 78-82.  
ZHANG XN, WEI HZ, JIN HX, *et al.* Determination of amygdalin of peach kernel formula granules by HPLC and evaluation of its measurement uncertainty [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2019, 1(31): 78-82.
- [16] 施元旭, 张水锋, 潘项捷, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中恩诺沙星、环丙沙星残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 37-42.  
SHI YX, ZHANG SF, PAN XJ, *et al.* Evaluation of uncertainty in determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Mach, 2020, 36(10): 37-42.

(责任编辑: 于梦娇)

## 作者简介



许莺婷, 主管药师, 主要研究方向为  
食品药品检测与质量管理。  
E-mail: 25434569@qq.com