

超高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中甲硝唑及羟基甲硝唑残留量的不确定度评定

王璐璐, 张水锋*, 施元旭, 冯婷婷, 陆文琪, 盛华栋, 潘项捷

(浙江方圆检测集团股份有限公司, 杭州 310018)

摘 要: **目的** 评定分析超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定豆芽中甲硝唑以及羟基甲硝唑的残留量的不确定度。**方法** 试样经乙酸乙酯提取 2 次, 旋转蒸发, 混合阳离子交换柱净化, 经 Infinity Lab Poroshell SB-Aq 色谱柱分离, 采用 UPLC-MS/MS 检测, 内标法进行定量分析。**结果** 标准曲线拟合以及标准溶液配制产生的不确定度分量最大, 当豆芽中甲硝唑含量为 10.1 $\mu\text{g/kg}$ 时, 其扩展不确定度 $U=2.1 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$); 当豆芽中羟基甲硝唑含量为 10.3 $\mu\text{g/kg}$ 时, 其扩展不确定度 $U=1.7 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$)。**结论** 豆芽中不确定度最主要来源于标准曲线的拟合以及标准溶液的配制过程, 其次是回收率, 其他因素的影响较小。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 甲硝唑; 羟基甲硝唑; 不确定度; 豆芽

Uncertainty evaluation for determination of metronidazole and hydroxymetronidazole residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Lu-Lu, ZHANG Shui-Feng*, SHI Yuan-Xu, FENG Ting-Ting, LU Wen-Qi, SHENG Hua-Dong, PAN Xiang-Jie

(Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination the residues of metronidazole and hydroxy metronidazole residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by ethyl acetate for twice, then purified by rotating evaporation and mixed cation exchange column. The samples were separated by Infinity Lab Poroshell SB-Aq column, detected by UPLC-MS/MS, and quantitatively analyzed by internal standard method. **Results** Standard curve fitting and standard solution preparation produced the largest uncertainty component. When the metronidazole content in bean sprouts was 10.1 $\mu\text{g/kg}$, the expanded uncertainty $U=2.1 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$). When the content of hydroxy metronidazole in bean sprouts was 10.3 $\mu\text{g/kg}$, the expansion uncertainty $U=1.7 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$). **Conclusion** The uncertainty of bean sprouts is mainly derived from the fitting of standard curve and the configuration of standard solution, followed by the recovery rate, and other factors have little influence.

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项(2020YJ014)

Fund: Supported by the Technical Support Project of State Administration of Market Supervision and Administration (2020YJ014)

***通信作者:** 张水锋, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: seafling@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Shui-Feng, Ph.D, Senior Engineer, Zhejiang Fangyuan Test Group Co. Ltd. No.300, Xiasha Road, Qiantang, Hangzhou 310018, China. E-mail: seafling@163.com

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; metronidazole; hydroxy metronidazole; uncertainty; bean sprouts

0 引言

豆芽, 品种丰富, 营养全面, 是常见的蔬菜。豆芽能减少体内乳酸堆积, 消除疲劳, 同时富含极易被人体吸收的各种微量元素和生物活性水, 可以防止雀斑, 使皮肤变白, 同时豆芽还具有抗癌的作用, 物美价廉深受人们喜爱。但豆芽养殖过程中对水的需求特别高, 且需要注意控水防腐, 否则非常容易出现腐烂情况。因此市面上存在不法商贩在豆芽的生产过程中违法添加抗生素等药物的行为, 以期达到豆芽长时间不腐烂不变质的效果^[1-6]。

甲硝唑, 是一种抗生素和抗原虫剂, 属于硝基咪唑类药物, 主要用于治疗或预防厌氧菌引起的系统或局部感染。农业农村部公告第 235 号中规定, 甲硝唑为允许作治疗用, 但不得在食品中检出。甲硝唑对人体有多种毒副作用, 尤其是具有潜在致癌性和致遗传性变异作用, 而且甲硝唑进入人体后能快速分布于全身^[7-10]。人体一旦摄入甲硝唑, 会对消化道产生不良反应, 包括恶心、呕吐、食欲不振、腹部绞痛; 神经系统症状有头痛、眩晕, 偶有感觉异常、肢体麻木、共济失调、多发性神经炎等, 大剂量可致抽搐。羟基甲硝唑为甲硝唑的代谢物产物。

不确定度表示在实验测量结果中由于测量误差的存在, 而对被测量值不能确定的程度, 用于表示被测量的真值存在于某一个量值范围的评定, 真实地反映测量结果的可信程度, 是一个确定的值。不确定度数值的大小反映了测量结果质量的高低, 并直接与检验结果的合格判定相关, 由于实验不可避免地存在不确定度, 将其应用于测定结果评定中, 对提高检测结果的质量、降低误判风险具有重要意义^[6,11-15]。目前已有市售豆芽检出甲硝唑的相关新闻^[10], 但国家标准中并没有制定检测豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑的方法。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测市售豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑的含量, 依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和 JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》评定检测豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑残留量的不确定度, 确保检测数据准确可靠^[16-20]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆芽购于当地农贸市场, 作为空白样品基质。阳性样品为实验室制备, 含量为 10 μg/kg。

AB Sciex5500 Qtrap 三重四极杆串联质谱仪(配有电

喷雾离子源)(美国 SCIEX 公司); Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); ST16R 高速冷冻离心机(美国赛默飞 Sorvall 公司); HY-2A 调速振荡器(江苏金坛荣华有限公司); VG3 S025 涡旋混合器、T25 高速匀浆机(德国 IKA 公司); GM200 刀式研磨仪(德国 Retsch 公司)。

甲硝唑(0.25 g/瓶, 99.9%)(坛墨质检科技股份有限公司); 羟基甲硝唑(50 mg/瓶, 99.4%)、氘代甲硝唑-D₄ (10 mg/瓶, 96.3%)、氘代羟基甲硝唑-D₂ (10 mg/瓶, 99.8%)(北京振翔科技有限公司); 阳离子交换柱 Oasis MCX (美国 Waters 公司); 实验用水均为符合 GB/T 6682—2008《食品安全国家标准 分析实验室用水国家标》的实验室一级用水; 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

豆芽用研磨仪制成匀浆备用。称取 5 g (精确至 0.01 g) 试样, 于 50 mL 离心管中, 准确加入 20 μL 内标工作液涡旋 1 min, 避光放置 10 min, 加入 10 g 无水硫酸钠, 涡旋混匀, 加入 20 mL 乙酸乙酯, 涡旋 3 min, 超声提取 6 min, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液转移到旋蒸瓶中。残渣用 20 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并 2 次提取液, 于 40 °C 水浴旋转蒸发近干。加入 0.1 mol/L 盐酸 5 mL 涡旋溶解残渣, 待净化。

取混合阳离子交换固相萃取小柱, 依次用 5 mL 甲醇、5 mL 0.1 mol/L 盐酸活化平衡, 将上述待净化液加入到固相萃取小柱上, 依次用 5 mL 0.1 mol/L 盐酸、5 mL 甲醇淋洗, 最后用 5 mL 氨水甲醇洗脱并收集, 收集液在 40 °C 水浴中氮吹至干, 最后用 1.0 mL 0.1%甲酸甲醇水溶液定容后, 过 0.22 μm 滤膜, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.2.2 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 °C; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 35 °C; 流动相: A 为甲醇; B 为 0.1%甲酸水溶液。梯度洗脱条件见表 1。

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

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.25	10	90
2	0.25	10	90
3.5	0.25	90	10
4.5	0.25	90	10
5	0.25	10	90
6	0.25	10	90

1.2.3 质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI): 正离子模式; 扫描模式: 多反应检测模式 (multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 5.5 kV; 离子源温度: 550 °C; 气帘气压力: 30 psi; 雾化气压力: 50 psi; 辅助气压力: 50 psi。质谱参数见表 2。

表 2 甲硝唑和羟基甲硝唑的主要质谱参数
Table 2 Main mass spectrometric parameters of metronidazole and hydroxy metronidazole

编号	化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压 /V	碰撞能量 /V
1	甲硝唑	172.1	128.0* 82.0	70	20 33
2	甲硝唑-D ₄	176.1	82.1	70	20
3	羟基甲硝唑	188.1	123.1* 126.1	70	17 24
4	羟基甲硝唑-D ₂	190.1	128.1	70	24

注: *为定量离子。

1.2.4 数学模型

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

式中: *X* 为样品中甲硝唑、羟基甲硝唑的含量, μg/kg; *C* 为样品中甲硝唑、羟基甲硝唑测定浓度, μg/L; *V* 为提取液的定容体积, mL; *m* 为样品质量, g; *f_r* 为待测物质的回收率, %。

2 结果与分析

2.1 样品的不确定度来源分析

根据实验检测步骤和建立的数学模型, UPLC-MS/MS 测定豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑残留量的不确定度主要有以下几个方面: (1)测试过程随机效应引入的不确定度 *u_{rel}*(*X*); (2)称样量引起的不确定度 *u_{rel}*(*m*); (3)样品定容引起的不确定度 *u_{rel}*(*V*); (4)标准曲线拟合的不确定度 *u_{rel}*(*curve*); (5)标准溶液配制的不确定度 *u_{rel}*(*c*); (6)回收率测试过程随机效应的不确定度 *u_{rel}*(*rec*)。

2.2 不确定度的评定

2.2.1 测试过程随机效应引入的不确定度 *u_{rel}*(*X*)

包括样品制样过程的均匀性、样品提取液和定容液的浓度和纯度、电子天平的稳定性、移液器和容量瓶定容等因素引入的不确定度。

平行测定 6 份样品(*n*=6), 用 UPLC-MS/MS 测定, 结果见表 3。用贝塞尔公式计算, 6 次阳性样品测得值的标准

偏差 $s(X) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$, 标准不确定度 $u(X) = \frac{s(X)}{\sqrt{n}}$,

相对标准不确定度 $u_{rel}(X) = \frac{u(X)}{\bar{X}}$ 。

2.2.2 样品称量引入的不确定度 *u_{rel}*(*m*)

称取豆芽 5.00 g, 百分之一天平校准证书说明天平最大容许误差为±0.05 g, 取均匀分布, *u*(*m*)=0.05 g/√3=0.02887 g, *u_{rel}*(*m*)=0.02887 g/5 g=0.005774。

2.2.3 样品定容引入的不确定度 *u_{rel}*(*V*)

样品定容 1 mL, 根据可调移液枪的校准证书, 1 mL 量程的可调移液枪允许的误差为±10 μL, 属于均匀分布, *k*=√3, 不确定度 *u*(*V*)=10 μL/√3=0.005774 mL, 相对标准不确定度 *u_{rel}*(*V*)=0.005774 mL/1 mL=0.005774。

2.2.4 标准曲线拟合引入的不确定度 *u_{rel}*(*curve*)

配制 6 个不同质量浓度的标准溶液作标准曲线, 每个浓度点的标准溶液分别重复测定 3 次, 以标准溶液浓度 *X_i* (μg/L)为横坐标, 以标物的外标定量离子峰面积与内标定量离子峰面积之比 $\frac{A_{外标}}{A_{内标}}$ 为纵坐标, 用最小二乘法拟合, 线性回归方程以及线性相关系数 *r*² 见表 4。

分别重复测定样品 6 次, *X*₀ 为样品平均浓度, 线性回归方程导致 *X*₀ 的标准不确定度 *u*(*curve*)=

$\frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(X_0 - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$ 其中, $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (a + bX_i)]^2}{n-2}}$ 。

为标准曲线的标准偏差; *b* 为斜率; *a* 为截距; *n*=18, 为测试标准溶液的实验次数; $\bar{x}$ 为标准溶液浓度的平均值; *u_{rel}*(*curve*)=*u*(*curve*)/*X*₀, 计算结果见表 5。

表 3 测试过程随机效应引入的不确定度 *u_{rel}*(*X*)计算结果
Table 3 Repeatability relative standard uncertainty *u_{rel}*(*X*) calculation results

待测物	测定值/(μg/kg)						平均值/(μg/kg)	<i>s</i> (<i>X</i>)	<i>u_{rel}</i> (<i>X</i>)
	1	2	3	4	5	6			
甲硝唑	10.127	9.998	10.002	10.120	10.112	10.007	10.061	0.06450	0.002617
羟基甲硝唑	10.313	10.139	10.598	10.702	10.065	10.012	10.305	0.2879	0.01141

表 4 甲硝唑和羟基甲硝唑残留量线性回归方程及相关系数
Table 4 Linear regression equations and correlation coefficients of metronidazole and hydroxymetronidazole residues

化合物	$X_i/(\mu\text{g/L})$	$\frac{A_{\text{外标}}}{A_{\text{内标}}}$			线性方程	相关系数(r^2)
		1	2	3		
甲硝唑	1	0.8050	0.8000	0.8120	$A=0.847X+1.190$	0.998
	5	4.9920	4.9980	5.0020		
	10	10.6900	10.4930	10.5790		
	20	17.6520	17.5980	17.6900		
	50	46.0020	46.0120	45.9890		
	100	84.7580	84.7940	84.8200		
	1	0.105	0.103	0.0996		
羟基甲硝唑	5	0.202	0.209	0.205	$A=0.04000X+0.01500$	0.999
	10	0.409	0.402	0.404		
	20	0.810	0.806	0.800		
	50	2.030	2.010	1.994		
	100	4.017	4.106	4.072		

表 5 $u_{\text{rel}}(\text{curve})$ 计算结果
Table 5 Calculation results of $u_{\text{rel}}(\text{curve})$

待测物	$X_0/(\mu\text{g/L})$	$\bar{x}/(\mu\text{g/L})$	S	b	a	$u_{\text{rel}}(\text{curve})$
甲硝唑	10.061	31	1.3738	0.8470	1.1900	0.07937
羟基甲硝唑	10.305	31	0.03533	0.04000	0.01500	0.04261

2.2.5 标准溶液配制过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(c)$

标准溶液配制过程引入的不确定度主要包括甲硝唑、羟基甲硝唑标准品的纯度、标准品称量和定容、标准溶液稀释定容、标准曲线配制引入的不确定度。

(1)原始标准物质引入的不确定度

甲硝唑的纯度为 99.3%, $U=0.5\%$, 其相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P_1)=0.005/0.993=0.005035$ 。羟基甲硝唑的纯度为 99.4%, $U=\pm 2\%$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P_2)=0.02/0.994=0.002012$ 。

氘代甲硝唑 D_4 的纯度为 96.3%, $U=\pm 2\%$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P_3)=0.02/0.963=0.02077$ 。氘代羟基甲硝唑 D_2 的纯度为 99.8%, $U=\pm 0.5\%$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P_4)=0.005/0.998=0.005010$ 。

甲硝唑标准物质纯度和内标物质纯度合成相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(P_{\text{甲}})=\sqrt{u_{\text{rel}}(P_1)^2+u_{\text{rel}}(P_3)^2}=0.005422$; 羟基甲硝唑标准物质纯度和内标物质纯度合成相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(P_{\text{羟基}})=\sqrt{u_{\text{rel}}(P_2)^2+u_{\text{rel}}(P_4)^2}=0.02137$ 。

(2)称量标准品引入的不确定度

用电子天平准确称量甲硝唑标准物质 11.02 mg, 电子天

平校准证书表明该天平最大允许称量误差为 $\pm 0.05\text{ mg}$, 为均匀分布, 测量不确定度 $u(c_{\text{甲}})=0.05\text{ mg}/\sqrt{3}=0.02887\text{ mg}$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{\text{甲}})=0.02887\text{ mg}/11.02\text{ mg}=0.002620$ 。称取羟基甲硝唑 10.98 mg, 测量不确定度 $u(c_{\text{羟基}})=0.05\text{ mg}/\sqrt{3}=0.02887\text{ mg}$, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{\text{羟基}})=0.02887\text{ mg}/10.98\text{ mg}=0.002629$ 。

内标物质均为 10 mg, 一次性溶解, 无需计算由称量而产生的不确定度。

(3)标准储备液定容引入的不确定度

标准储备液定容引入的不确定度来源分别为定容液的体积膨胀引入的不确定度和 10 mL 容量瓶引入的不确定度。

根据容量瓶检定规程 JJG 196—2006《常用玻璃量具》, A 级容量瓶的允许误差为 $\pm 0.020\text{ mL}$, 服从三角分布, 由此引入的不确定度为: $u(c_{21})=0.020\text{ mL}/\sqrt{6}=0.008165\text{ mL}$, $u_{\text{rel}}(c_{21})=0.008165\text{ mL}/10\text{ mL}=0.0008165$ 。

根据 JJG 196—2006 规定, 10 mL 容量瓶检定是在 20 °C 环境条件下进行的, 本实验在 20 °C ± 5 °C 环境条件下操作, 甲醇的体积膨胀系数为 $1.1\times 10^{-3}/\text{°C}$, $\Delta V=10\times 1.1\times 10^{-3}\times 5=0.055\text{ mL}$, 服从均匀分布, $u(V_0)=0.055\text{ mL}/\sqrt{3}=0.0318\text{ mL}$, $u_{\text{rel}}(V_0)=$

0.0318 mL/10 mL=0.00318。

因此，分别定容甲硝唑、羟基甲硝唑、氘代甲硝唑 D₄ 和氘代羟基甲硝唑 D₂ 的合成相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(C_{甲2}) = \sqrt{2u_{rel}(C_{21})^2 + 2u_{rel}(C_1)^2} = 0.004643; u_{rel}(C_{羟基2}) = 0.004643。$$

(4)标准溶液稀释引入的不确定度

取 100 μL 浓度为 1.0 mg/mL 的甲硝唑标准溶液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇配制成 10.0 mg/L 的标准溶液。使用 20~ 200 μL 量程的移液枪取 100 μL 的标准溶液，允许误差为±2.0%，服从均匀分布，引入的不确定度为： $u(C_{31}) = 100 \mu L \times 2.0\% / \sqrt{3} = 1.1547 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{31}) = 1.1547 \mu L / 100 \mu L = 0.01155$ 。

根据 JJG 196—2006，10 mL 容量瓶的允许误差为 ±0.020 mL，服从三角分布，引入的不确定度为 $u(C_{32}) = 0.020 \text{ mL} / \sqrt{6} = 0.008165 \text{ mL}$ ， $u_{rel}(C_{32}) = 0.008165 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 0.0008165$ 。定容液体体积膨胀引起的不确定度计算方式同 (3)， $u(V_{21}) = 0.055 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.03175 \text{ mL}$ ， $u_{rel}(V_{21}) = 0.03175 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 0.003175$ 。

甲硝唑标准溶液稀释引起的合成相对不确定度为：

$$u_{rel}(C_{甲3}) = \sqrt{u_{rel}(C_{31})^2 + u_{rel}(C_{21})^2 + u_{rel}(C_{32})^2} = 0.01201。$$

同理，羟基甲硝唑标准溶液稀释引起的合成相对不确定度为： $u_{rel}(C_{羟基3}) = 0.01201$ 。

取 100 μL 1.0 mg/mL 的氘代甲硝唑 D₄ 溶液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇配制成 1.0 mg/L 的标准溶液。使用 20~200 μL 量程的移液枪取 100 μL 的标准溶液，允许误差为±2.0%，服从均匀分布，引入的不确定度为： $u(C_{51}) = 100 \mu L \times 2.0\% / \sqrt{3} = 1.1547 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{51}) = 1.1547 \mu L / 100 = 0.01155$ 。

同上，用 100 mL 玻璃容量瓶定容氘代甲硝唑 D₄ 引入的不确定度 $u(C_{52}) = 0.1 \text{ mL} / \sqrt{6} = 0.04082 \text{ mL}$ ， $u_{rel}(C_{52}) = 0.04082 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 0.0004082$ 。定容液体体积膨胀不确定度 $u(V_{31}) = 0.55 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.318 \text{ mL}$ ， $u_{rel}(V_{31}) = 0.318 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 0.00318$ 。

氘代甲硝唑 D₄ 溶液稀释引起的合成相对标准不确定度为： $u_{rel}(C_{甲4}) = \sqrt{u_{rel}(C_{51})^2 + u_{rel}(C_{31})^2 + u_{rel}(C_{52})^2} = 0.01199$ 。

同理，氘代羟基甲硝唑 D₂ 溶液稀释引起的合成相对不确定度为： $u_{rel}(C_{羟基4}) = 0.01199$ 。

(5)标准曲线配制引入的不确定度

分别取 10、20、50、150、200 μL 浓度为 10.0 mg/L 的甲硝唑标准溶液，甲醇定容。2~20 μL 和 20~200 μL 量程的移液器，根据移液枪校准证书，每个浓度点移液器允许相对偏差分别为±8.0%、±4.0%、±3.0%、±1.5%、±1.5%，服从均匀分布，由移液枪引入的不确定度分别为： $u(C_{71}) = 10 \mu L \times 8.0\% / \sqrt{3} = 0.4619 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{71}) = 0.4619 \mu L / 10 \mu L = 0.04619$ ； $u(C_{72}) = 20 \text{ L} \times 4.0\% / \sqrt{3} = 0.4619 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{72}) = 0.4619 \mu L / 20 \mu L = 0.02310$ ； $u(C_{73}) = 50 \mu L \times 3.0\% / \sqrt{3} = 0.8660 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{73}) = 0.8660 \mu L / 50 \mu L = 0.01732$ ； $u(C_{74}) = 150 \mu L \times 1.5\% / \sqrt{3} = 1.2990 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{74}) = 1.2990 \mu L / 150 \mu L = 0.00866$ ； $u(C_{75}) = 200 \mu L \times 1.5\% / \sqrt{3} = 1.7321 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{75}) = 1.7321 \mu L / 200 \mu L = 0.008660$ 。

样品中加入 1.0 mg/L 甲硝唑内标溶液 100 μL，20~200 μL 量程的移液枪，根据校准证书，100 μL 的允许误差为±2.0%，服从均匀分布，由此引入的不确定度为： $u(C_{76}) = 100 \mu L \times 2\% / \sqrt{3} = 1.1547 \mu L$ ， $u_{rel}(C_{76}) = 1.1547 \mu L / 100 \mu L = 0.01155$ 。

10 mL 容量瓶定容引入的不确定度，得到的相对不确定度 $u_{rel}(C_{10 \text{ mL}}) = 0.003283$ 。

配制甲硝唑标准曲线引入的合成相对不确定度：

$$u_{rel}(C_{甲5}) = \sqrt{u_{rel}(C_{71})^2 + u_{rel}(C_{72})^2 + u_{rel}(C_{73})^2 + u_{rel}(C_{74})^2 + u_{rel}(C_{75})^2 + 5u_{rel}(C_{76})^2 + 5u_{rel}(C_{10 \text{ mL}})^2} = 0.06195。$$

因此，配制羟基甲硝唑标准曲线引入的相对不确定度 $u_{rel}(C_{羟基5}) = 0.06195$ 。

标准曲线稀释配制过程和添加内标引入的合成相对不确定度为：

$$u_{rel}(C_{甲}) = \sqrt{u_{rel}(C_{甲1})^2 + u_{rel}(C_{甲2})^2 + u_{rel}(C_{甲3})^2 + u_{rel}(C_{甲4})^2 + u_{rel}(C_{甲5})^2 + u_{rel}(C_{甲6})^2 + u_{rel}(P_{甲})^2} = 0.06468; u_{rel}(C_{羟基}) = 0.06790。$$

2.2.6 回收率测试过程随机效应引入的不确定度 $u_{rel}(\text{rec})$

由于目标化合物从样品基质中不能完全提取出来，提取、氮吹过程的损失导致较大的不确定度，对样品前处理产生的不确定度用回收率方法计算。

按照方法的要求对同一个样品重复加标 6 次，上机测定甲硝唑和羟基甲硝唑的加标回收率，结果见表 6。根据贝塞尔公式计算得到 6 次实验结果的标准偏差。 $u_{rel}(\text{rec}) = u(\text{rec}) / \bar{X}$ 。

表 6 $u_{rel}(\text{rec})$ 计算结果
Table 6 calculation results of $u_{rel}(\text{rec})$

待测物	回收率/%						平均值 $\bar{X}$ %	s(X)	$u(\text{rec})$	$u_{rel}(\text{rec})$
	1	2	3	4	5	6				
甲硝唑	10.127	9.998	10.002	10.120	10.112	10.007	10.061	0.06450	0.0263	0.002617
羟基甲硝唑	10.313	10.139	10.598	10.702	10.065	10.012	10.305	0.2879	0.1175	0.01141

2.3 合成不确定度

甲硝唑和羟基甲硝唑的相对不确定度分量见表 7, 若不考虑各不确定度的相关性, 则其合成不确定度按公式

$$u_{rel}(W) = \sqrt{u_{rel}^2(X) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(\text{curve}) + u_{rel}^2(c) + u_{rel}^2(\text{rec})}$$
 计算。
 $u_{rel}(W_{\text{甲}})=0.1028; u_{rel}(W_{\text{羟基}})=0.08218。$

2.4 扩展不确定度及结果表示

根据 CNAS—GL 006:2018《化学分析中不确定度的评估指南》取包含因子 $k=2$ (95%置信度)时, 扩展不确定度 $U=u_{rel}(W) \times 2 \times X$, 由此得到豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑的测量结果, 见表 8。

3 结 论

本研究以豆芽为研究对象, 经乙酸乙酯提取 2 次, 旋

转蒸发, 混合阳离子交换柱净化, 经 Infinity Lab Poroshell SB-Aq 色谱柱分离, UPLC-MS/MS 进行检测, 内标法进行定量分析。根据计算公式以及数学模型, 对豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑残留量的不确定度各分量进行评定。评定结果表明, 当豆芽中甲硝唑含量为 10.1 μg/kg 时, 其扩展不确定度 $U=2.1 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$); 当豆芽中羟基甲硝唑含量为 10.3 μg/kg 时, 其扩展不确定度 $U=1.7 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$)。测定结果的不确定度最主要来源于标准曲线的拟合以及标准溶液的配制过程, 其次是回收率, 其他因素的影响较小。因此, 在实验过程中, 可以采取增加标准曲线溶液的次数, 同时实验增加检测的平行次数, 定期对检验人员进行水平考核, 已确保操作水准, 减少因人为误差而引入的不确定度。从各个环节把控全局, 保证实验结果的准确性和可靠性, 降低实验室风险。

表 7 甲硝唑和羟基甲硝唑相对不确定度分量
Table 7 Relative uncertainty components for metronidazole and hydroxy metronidazole

不确定度分量	不确定度来源	相对标准不确定度	
		甲硝唑	羟基甲硝唑
$u_{rel}(X)$	测试过程随机效应	0.002617	0.01141
$u_{rel}(m)$	样品称量	0.005774	0.005774
$u_{rel}(V)$	样品定容	0.005774	0.005774
$u_{rel}(\text{curve})$	标准曲线拟合	0.07937	0.04261
$u_{rel}(c)$	标准溶液配制	0.06468	0.06790
$u_{rel}(\text{rec})$	回收率测试过程的随机效应	0.002617	0.01141

表 8 豆芽中甲硝唑和羟基甲硝唑不确定度评定结果
Table 8 Uncertainty evaluation for metronidazole and hydroxy metronidazole in bean sprouts

项目	甲硝唑	羟基甲硝唑
实测值 $X/(\mu\text{g/kg})$	10.127	10.313
合成相对不确定度	0.1028	0.08218
扩展不确定度 $U/(\mu\text{g/kg})$	2.082	1.695
检测结果 $U/(\mu\text{g/kg})$	10.127 ± 2.1	10.313 ± 1.7

参考文献

[1] 丁丽, 曾邵东, 魏晓奕. 超高效液相色谱—质谱法测定豆芽中多菌灵、2,4-二氯苯氧乙酸、恩诺沙星残留[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 69–75.
DING L, ZENG SD, WEI XY. Determination of carbendazim, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and enrofloxacin residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Sci, 2014, 35(22): 69–75.

[2] 施元旭, 张水锋, 潘项捷, 等. 超高效液相色谱串联质谱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): 43–48.

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): 43–48.

[3] 曾志杰, 刘红, 李传勇. 豆芽中 6-苄基腺嘌呤残留测量的不确定度评定[J]. 福建分析测试, 2016, 25(3): 19–23.
ZENG ZJ, LIU H, LI CY. Evaluation of uncertainty for determination of 6-benzyladenine residues in bean sprouts [J]. Fujian Anal Test, 2016, 25(3): 19–23.

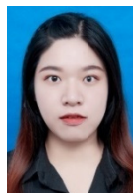
[4] 曹慧, 陈小珍, 祝颖, 等. QuEChERS/超高效液相色谱—串联质谱技术同时测定食品中 13 种植物生长调节剂残留[J]. 化学试剂, 2013, 35(11): 1005–1009.
CAO H, CHEN XZ, ZHU Y, *et al.* QuEChERS/ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry technology simultaneous determination of 13 plant growth regulator residues in food [J]. Chem Reagents, 2013, 35(11): 1005–1009.

[5] 郭立净, 王赛楠. 液相色谱-高分辨质谱法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸的相对不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5203–5208.
GUO LJ, WANG SN. Evaluation of uncertainty in the determination of 4-chlorophenoxyacetic acid in bean sprouts by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020,

- 11(15): 5203–5208.
- [6] 李倩. 浅谈测量不确定度的意义及其在实验室质量管理中的应用[J]. 科技创新与应用, 2015, (14): 176–177.
- LI Q. Talking about the significance of measurement uncertainty and its application in laboratory quality management [J]. Technol Innov Appl, 2015, (14): 176–177.
- [7] 陈君, 安东各, 许莉, 等. 豆芽中甲硝唑、多菌灵、赤霉素、6-苄基腺嘌呤、2, 4-二氯苯氧乙酸的定量检测[J]. 化学通报, 2014, 77(9): 916–918.
- CHEN J, AN DG, XU L, *et al.* Quantitative detection of metronidazole, carbendazim, gibberellin, 6-benzyl adenine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean sprouts [J]. Chem Bull, 2014, 77(9): 916–918.
- [8] 罗文婷, 吴青, 简伟明, 等. 超高效液相色谱法测定水产品中违禁兽药氯霉素、呋喃唑酮和甲硝唑残留[J]. 分析化学, 2009, 37(6): 877–880.
- LUO WT, WU Q, JIAN WM, *et al.* Determination of banned veterinary drugs chloramphenicol, furazolidone and metronidazole residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2009, 37(6): 877–880.
- [9] 郭礼强, 张金玲, 李凯, 等. HPLC-MS/MS 测定饲料中甲硝唑和二甲硝咪唑含量[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(1): 52–56.
- GUO LQ, ZHANG JL, LI K, *et al.* Determination of metronidazole and dimetridazole in feed by HPLC-MS/MS method [J]. Chin J Vet Med, 2017, 51(1): 52–56.
- [10] 盛佳慧. 非法添加生长素抗生素金东区查处豆芽系列案[EB/OL]. [2019-11-27]. <http://jdnews.zjol.com.cn/jdnews/system/2019/11/27/032041511.shtml> [2021-03-18].
- SHENG JH. Illegal addition of auxin antibiotics Jindong District investigates and handles bean sprouts series of cases [EB/OL]. [2019-11-27]. <http://jdnews.zjol.com.cn/jdnews/system/2019/11/27/032041511.shtml> [2021-03-18].
- [11] 胡竣杰, 马文俊, 刘飞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定毛发中4种苯丙胺类兴奋剂含量的不确定度评估[J/OL]. 化学试剂, 2021, DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2021008079
- HU JJ, MA WJ, LIU F, *et al.* Evaluation of uncertainty in the determination of four amphetamine-type stimulants in hair by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. Chem Reagents. 2021, DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2021008079
- [12] 王静, 马晓静. 液相色谱-串联质谱内标法测定全麦粉中呕吐毒素含量的不确定度评定[J]. 食品安全导刊, 2021, (7): 60–64.
- WANG J, MA XJ. Uncertainty evaluation of the determination of vomiting toxin in whole wheat flour by liquid chromatography-tandem mass spectrometry internal standard method [J]. Chin Food Saf Magaz, 2021, (7): 60–64.
- [13] 陈婷, 彭涛, 张文, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中4-氯苯氧乙酸钠残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3): 1076–1082.
- CHEN T, PENG T, ZHANG W, *et al.* Evaluation of uncertainty in the determination of sodium 4-chlorophenoxyacetate residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(3): 1076–1082.
- [14] 唐韵熙. 高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤残留量的不确定度评定[J]. 现代食品, 2021, (1): 174–180.
- TANG YX. Evaluation of uncertainty in the determination of 4-chlorophenoxyacetic acid and 6-benzyl adenine residues in bean sprouts by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Mod Food, 2021, (1): 174–180.
- [15] 李静, 张居舟, 余晓娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中植物生长调节剂残留量的不确定度评定[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 292–297.
- LI J, ZHANG JZ, YU XJ, *et al.* Uncertainty evaluation of the determination of plant growth regulator residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2019, 40(10): 292–297.
- [16] 蒙利琼, 金其杨, 蓝端容. 高效液相色谱-串联质谱法测定罗非鱼中甲硝唑残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8298–8302.
- MENG LQ, JIN QY, LAN MR. Evaluation of uncertainty in the determination of metronidazole residues in tilapia by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(22): 8298–8302.
- [17] 蓝草, 邹游, 欧阳少伦, 等. 液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中硝基咪唑类药物残留量的不确定度评估[J]. 农产品加工, 2017, (4): 35–40, 44.
- LAN C, ZOU Y, OUYANG SL, *et al.* Evaluation of uncertainty in the determination of nitroimidazole residues in food of animal origin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Agric Prod Process, 2017, (4): 35–40, 44.
- [18] 常立群, 胡春, 李晓雪. 液质联用法测定苹果中氧化乐果残留的不确定度评定[J]. 宁夏农林科技, 2019, 60(2): 4–7.
- CHANG LQ, HU C, LI XX. Uncertainty evaluation for the determination of omethoate in apple by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Ningxia J Agric Forest Sci Technol, 2019, 60(2): 4–7.
- [19] 王小乔, 许晓辉, 张虹艳, 等. 液质联用法测定保健品中西地那非含量的不确定度评定[J]. 甘肃科技, 2019, 35(16): 66–69.
- WANG XQ, XU XH, ZHANG HY, *et al.* Evaluation of uncertainty in determination of the content of sinafil in health care products by liquid mass spectrometry [J]. Gansu Sci Technol, 2019, 35(16): 66–69.
- [20] 余晓娟. 液质联用法测定鸡蛋中氟虫腈及其代谢物残留的不确定度报告[J]. 现代食品, 2019, (22): 171–176.
- YU XJ. Uncertainty report on determination of fipronil and its metabolites residues in eggs by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Mod Food, 2019, (22): 171–176.

(责任编辑: 王欣郑丽)

作者简介



王璐璐, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 835909478@qq.com



张水锋, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: seafling@163.com