

液相色谱质谱联用法测定鸡肉中恩诺沙星含量的不确定度评价

史 梅

新疆维吾尔自治区兽药饲料监察所, 乌鲁木齐 830000

摘要 通过分析液相色谱质谱联用法(LCMS)法测定鸡肉中恩诺沙星含量过程中多次重复测量、天平称量、标准品配制、定容体积等因素对结果的影响, 计算各因素的相对标准不确定度, 最终计算合成标准不确定度和扩展不确定度, 以期评定液相色谱质谱联用法(LCMS)测定鸡肉中恩诺沙星含量的不确定度。试验结果表明, 扩展不确定度为 $9.88 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$, 包含因子 $k=2$, 相对扩展不确定度为 2.5%。说明液相色谱质谱联用法(LCMS)测定鸡肉中恩诺沙星含量的不确定度应引入多次重复测量、天平称量、标准品配制、定容体积等因素。

关键词 恩诺沙星; 液相色谱质谱联用法; 不确定度

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)是一种氟喹诺酮类药物, 是家禽养殖中广泛使用的抗生素, 具有抗菌谱广、杀菌活性强等优点, 被广泛使用, 对预防和治疗动物细菌性疾病和支原体感染方面具有较高疗效^[1-2]。然而部分企业和养殖户为追求畜禽快速增长及预防其生病而忽略安全添加剂量, 无视休药期等规范用药而造成抗生素滥用。忽视用药规律而长期滥用抗生素会导致耐药性^[3-6], 最终影响畜禽产业发展和人类的健康。因此, 在畜禽产品中检测氟喹诺酮类药物含量非常有必要。在检测分析中, 由于受检测仪器、检测方法及试验误差的影响, 检测值往往低于真实值。如何判定检测结果真实有效, 不确定度是一个重要的参考指标。不确定度可反映测量结果的准确性和可靠性^[7], 其受诸多因素的影响。然而, 1 个试验的不确定度评价往往较为困难, 需要考虑诸多因素和试验环节。本文通过参照中国农科院建立的评价《鸡蛋和鸡肉中氟喹诺酮类药物及金刚烷胺残留测定操作细则》中恩诺沙星的不确定度的方法, 及其他相关技术文献和指南^[8-9], 评定液相色谱质谱联用法(LCMS)测定鸡肉中恩诺沙星含量的不确定度, 以期为氟喹诺酮类药物检测方法的改进提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

液相色谱质谱联用仪: Waters Xevo TQ-S, 美国沃特世公司; METTLER TOLEDO MS105DU 万分之一电子分析天平, METTLER TOLEDO 公司生产; Eppendorf 移液器(20、100、1 000 μL), 德国 Eppendorf 公司; C18 固相萃取柱(100 mg/3 mL), 安捷伦公司生产。恩诺沙星标准品(批号 50128, 德国 Dr 公司, 纯度 98.5%), 内标为恩诺沙星 D5 标准品, 乙腈、正己烷、乙酸、甲酸均为色谱纯, 氢氧化钠为分析纯, 水为一级水。

1.2 方 法

1) 恩诺沙星测量方法。

①标准品和内标工作液的配置。精密称取恩诺沙星标准品 10 mg, 用甲醇定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 制得质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 同位素内标配制按如上操作。用移液器将标准品和内标储备液逐级稀释, 最终用流动相定容上机工作液恩诺沙星和内标均为 20 ng/mL。

②样品前处理。取 2.00 g 鸡肉样品于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 1%乙酸乙腈, 涡旋提取 2

min, 10 000 /min 离心 5 min, 上清转入另一离心管中, 重复提取 1 次, 合并上清液, 50 °C 氮吹至干, 加磷酸盐 2 mL 溶解残渣, C18 固相萃取柱净化, 先用 2 mL 乙腈和 2 mL 磷酸盐缓冲液活化平衡, 将待净化液过柱, 用 2 mL 水淋洗, 真空抽干, 用 1 mL 0.1% 甲酸乙腈水溶液洗脱, 真空抽干, 洗脱液过 0.22 μm 滤膜后上机测定。

③ 色谱条件。

- A. 色谱柱: BEH C18 1.7 μm × 2.10 mm × 50 mm。
- B. 流速: 0.3 mL/min。
- C. 进样体积: 2 μL。
- D. 流动相: 0.1% 甲酸乙腈溶液。

④ 质谱条件。

- A. 离子源: 电喷雾离子源 (ESI+)。
- B. 扫描方式: 多反应离子监测 (MRM)。
- C. 离子源温度: 600 °C。
- D. 离子源喷雾电压: 5 500 V。

⑤ 结果计算。

恩诺沙星用恩诺沙星-D5 校准, 单点校准, 按如下公式计算恩诺沙星含量:

$$X = \frac{A A'_{is} C_s C_{is}}{A_s A_{is} C'_{is}} \times \frac{V}{m}$$

式中: A——待测样品中恩诺沙星的面积;

A'is——标准品中恩诺沙星内标的面积;

As——标准品中恩诺沙星的面积;

Ais——待测样品中恩诺沙星内标的面积;

Cs——标准品中恩诺沙星的质量浓度 (ng/mL);

Cis——样品中恩诺沙星内标的质量浓度 (ng/mL);

C'is——标准品中恩诺沙星内标的质量浓度 (ng/mL);

V——溶解残余物所用试样溶液体积;

m——供试试样的质量 (g)。

2) 测量不确定度分析。在本试验的不确定度分析中, 首先考虑多次测量引入的不确定度, 其次考虑每一步试验操作中可能影响结果的步骤操作产生的不确定度, 即样品称量、标准品配制、定容体积、恩诺沙星标准溶液峰面积和恩诺沙星内标峰面积这些因素引入的测量结果的不确定^[10]。

① 测量重复性的不确定度的确定。为了得到一

个可靠性较高的测量重复性标准偏差, 在本次试验测量中, 平行测量 6 个试验样品, 测量值见表 1。

6 个样品恩诺沙星含量的平均值为 9.88 μg/kg, 按贝塞尔公式计算测量重复性标准。

$$s(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.157$$

相对标准偏差 RSD 为:

$$RSD = \frac{s(X)}{\bar{X}} = \frac{0.157}{9.88} = 0.016$$

在以 6 个样品的平均值报告测量结果时, 相对标准不确定度按如下公式计算:

$$u(f_{rep}) = RSD(\bar{X}) = \frac{RSD}{\sqrt{n}} = \frac{0.016}{\sqrt{6}} = 0.007$$

此分量已经合并了试样不均匀、环境条件的波动以及操作的差异等随机因素的影响。因此, 在随后进行的不确定度分量评定时就不需要再考虑这些随机因素的影响。

② 试样质量的不确定度的确定。天平校准证书说明校准的扩展不确定度为 0.05 mg, 包含因子 k=2, 因此其标准不确定度为 0.025 mg。试样质量为 2 g, 其相对标准不确定度应为 $u_{rel}(m) = 1.25 \times 10^{-5}$ 。

③ 定容体积的不确定度的确定。检定规程 JJG196-1990《常用玻璃量器》规定, 10 mL A 级容量瓶的允许误差为 0.02 mL, 假设为三角形分布, 其相对不确定度应为:

$$u_{rel}(V) = \frac{0.02}{10\sqrt{6}} = 0.0008$$

④ 恩诺沙星标准溶液的不确定度的确定。恩诺沙星标准品纯度为 98.5% ± 1.5%, 由于没有不确定度的其他信息, 假设是均匀分布, 标准不确定度 u(P) 的值为:

$$u(P) = \frac{0.015}{\sqrt{3}} = 0.0009$$

⑤ 恩诺沙星标准溶液峰面积和恩诺沙星内标峰面积测量引入的不确定度分量的确定。为确定恩诺沙星标准溶液峰面积的重复性标准偏差, 重复测量标准品浓度和内标质量浓度均为 20 ng/mL 的恩诺沙星标准品 6 次, 得到峰面积见表 2。

单次测量恩诺沙星峰面积的相对标准偏差按

表 1 6 个试验样品的恩诺沙星含量

样品序号	1	2	3	4	5	6
恩诺沙星含量/(μg/kg)	9.86	9.83	9.64	10.1	9.83	9.99

表 2 6 次恩诺沙星标准溶液峰面积

指标	1	2	3	4	5	6
As	64 092	64 927	64 720	64 872	65 031	63 900
A _{is}	7 850	7 730	7 638	7 747	7 692	7 693
As 平均值	64 590					
A _{is} 平均值	7 725					

如下公式计算:

$$u_{\text{rel}}(\text{As}) = s_{\text{rel}}(\text{As}) = \frac{1}{A_{\text{S}}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (A_{\text{Si}} - \bar{A})^2}{n-1}} = 0.007$$

取 6 次平均值的相对标准偏差为:

$$u_{\text{rel}}(\bar{\text{As}}) = \frac{s_{\text{rel}}(\bar{\text{As}})}{\sqrt{6}} = \frac{0.007}{\sqrt{6}} = 0.003$$

按相同公式计算得到内标面积的相对标准偏差:

$$u_{\text{rel}}(\bar{\text{Ais}}) = \frac{s_{\text{rel}}(\bar{\text{Ais}})}{\sqrt{6}} = \frac{0.009}{\sqrt{6}} = 0.004$$

3) 不确定度的合成。

试样中恩诺沙星 X 含量的合成不确定度按下式计算:

$$u(X) = X \times \sqrt{u^2(f_{\text{rep}}) + u^2(m) + u^2(V) + u^2(P) + u^2(\bar{\text{As}}) + u^2(\bar{\text{Ais}})}$$

$$= 9.88 \times \sqrt{0.007^2 + (1.25 \times 10^{-5})^2 + 0.0008^2 + 0.0009^2 + 0.003^2 + 0.004^2}$$

$$= 0.123 \mu\text{g}/\text{kg}$$

取包含因子 $k=2$, 扩展不确定度: $U(X) = ku(X) = 2 \times 0.123 = 0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$

相对扩展不确定度: $U_{\text{rel}}(X) = 0.25 \div 9.88 \times 100\% = 2.5\%$

2 讨论

目前测量不确定度的评定方法有 2 种, A 类方法和 B 类方法, A 类方法即测量不确定度的 A 类评价, 用试验标准偏差或它的倍数来表示, 只要某个是可以重复测量的, 在评价其不确定度时, 首先应当考虑重复测量引入的不确定度。本试验测量 6 个平行样本, 以此获得重复测量引入的不确定度。B 类方法是 B 类评定, 是用不同于测量不确定度 A 类评定的方法对测量不确定度分量进行的评定^[7,11], 是不具有统计规律引入的不确定度分析, 即对试验过程中使用的天平、量具等设备引入的不确定度。在本试验中, 考虑到了称样使用的天平、定容使用的容量瓶, 根据检定证书上的扩展不确定度, 计算标准不确定度。按照农业农村部推荐标准中规定的条件测定鸡肉中恩诺沙星残留量, 参考中国农科院建立方法《鸡蛋和鸡肉中氟喹诺酮类药物及金刚烷胺残留测

定操作细则》, 本试验测定 6 份样品取平均值报告结果, 其结果和扩展不确定度为 $9.88 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$, 包含因子 $k=2$, 相对扩展不确定度为 2.5%。

3 结论

利用液相色谱质谱联用法(LCMS)测定鸡肉中恩诺沙星含量时, 评价不确定度应引入多次重复测量、天平称量、标准品配制、定容体积等因素。

参考文献

- [1] 张乐, 刘超. 水产品体内血、肝、肾、肌肉中恩诺沙星及其代谢产物的测定研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(1): 116-117.
- [2] 彭涛, 雍炜, 安娟, 等. 反相高效液相色谱/质谱法同时测定鸡肉中 5 种喹诺酮类药物残留[J]. 分析化学研究报告, 2006, 34(9): 10-14.
- [3] MARTINEZ J L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants [J]. Environmental pollution, 2009, 157(11): 2893-2902.
- [4] GUSTAFSON, RICHARD H. Use of antibiotics in livestock and human health concerns[J]. Journal of dairy science, 1991, 74(4): 1428-1432.
- [5] SØRUM H, L'ABEE-LUND T M, SUMMONS R E, et al. Antibiotic resistance in food-related bacteria—a result of interfering with the global web of bacterial genetics [J]. Food microbiol, 2002, 78(1/2): 43-56.
- [6] WALLMANN J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals [J]. Food microbiol, 2006, 296(S2): 81-86.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-TRL-001 CNAS 技术报告: 医学实验室—测量不确定度的评定与表达[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [8] 邱英, 彭延岭. 测量不确定度评定与表示[J]. 机械工程师, 2007(4): 60-62.
- [9] 施昌彦. 测量不确定度评定与表示指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2000.
- [10] 杨莉, 朱乐亭, 赵明, 等. 液-质联用法测定人血浆中卡马西平浓度的不确定度评定[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(8): 603-607.
- [11] 李育敏, 徐怡, 阚丽娟, 等. 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 测量不确定度的评定与应用探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(3): 151-155.

【责任编辑: 胡 敏】