

液相色谱串联质谱法测定保健食品中 西布曲明的不确定度

Uncertainty evaluation for determination of sibutramine in health foods by
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

王赛楠 邓迎春 高天蓝星

WANG Sai-nan DENG Ying-chun GAO Tian-lan-xing

任梦柯 魏华琳 智文莉 郭旭光

REN Meng-ke WEI Hua-lin ZHI Wen-li GUO Xu-guang

(河南省口岸食品检验检测所, 河南 郑州 450003)

(Food Inspection and Testing Institute of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450003, China)

摘要:根据 BJS 201701《食品中西布曲明等化合物的测定》对保健食品中西布曲明含量进行定量分析,采用 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》对液相色谱串联质谱法测定保健食品中西布曲明含量的不确定度进行评定。结果表明,95%的置信区间下,保健食品中西布曲明含量测定结果可表示为 $(7.04 \pm 0.197) \mu\text{g/g}$, $k=2$, 其中标准曲线拟合过程中引入的不确定度影响最大。

关键词:不确定度;西布曲明;液相色谱串联质谱法;保健食品

Abstract: To evaluate the uncertainty of the determination of sibutramine content in health foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Methods according to BJS 201701 Determination of sibutramine in food, and the content of sibutramine in health foods was detected. According to the approach in measurement uncertainty and results indication (JJF 1059.1—2012), the uncertainty was analyzed, quantified and synthesized. When sibutramine content was $7.04 \mu\text{g/g}$, the extended uncertainty was $0.197 \mu\text{g/g}$ ($k=2$) under the 95% confidence interval. The main influence factors of the uncertainties in the determination were standard curve fitting process.

Keywords: uncertainty; sibutramine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; health foods

西布曲明是一种中枢神经抑制剂,主要通过其次级

和初级类代谢产物而产生作用,其作用机理为抑制 5-羟色胺、去甲肾上腺素、多巴胺的再摄取,增强饱食感并加速能量消耗,由此达到治疗肥胖症的效果。研究表明,西布曲明可能会导致口干、头痛、烦躁、失眠、厌食^[1-2],引起神经系统、呼吸系统、消化系统、生殖系统、心血管系统的不良反应^[3]。2010 年,中国国家药监局要求停止西布曲明的生产、销售和使用,但违规添加西布曲明制造假冒减肥药、减肥食品的案件仍层出不穷^[4-6]。

不确定度是评价测量结果质量的指标,其值越小,试验值与真实值越接近^[7-8]。文章拟根据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和 CNAS-GL06:2006《化学分析中不确定度的评估指南》的规定,建立测量模型,对液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法测定保健食品中西布曲明含量的不确定度进行分析,找出影响检测结果的关键因素,旨在为保健食品中西布曲明的检测数据使用和准确评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

液相色谱串联质谱仪:TSQ ALTIS 型,配有电喷雾离子源 ESI,美国 Thermo 公司;

电子天平:XPE205TDR 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

电子天平:ME204 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

盐酸西布曲明标准品(CAS: 84485-00-7):纯度 99.9%,中国食品药品检定研究院;

甲酸:色谱纯,美国 Thermo 公司;

甲醇:色谱纯,德国 Merck 公司;

作者简介:王赛楠,女,河南省口岸食品检验检测所助理工程师。

通信作者:郭旭光(1972—),男,河南省口岸食品检验检测所副主任药师,硕士。E-mail:371493234@qq.com

收稿日期:2020-01-07

保健食品(能力验证样品):中位值 6.83 μg/g,中国食品药品检定研究院。

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理 精密称取待测样品 1 g(精确到 0.001 g),精密加入 10 mL 甲醇适量,超声 10 min,冷却,称重,加甲醇补足重量,摇匀,静置,过 0.22 μm 滤膜。取续滤液 1 mL 定容至 10 mL,摇匀,供液相色谱串联质谱测定。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm);流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱程序:0.0~1.0 min,10% 甲醇;1.0~1.5 min, 10%~85% 甲醇;1.5~3.5 min, 85% 甲醇;3.5~4.0 min,85%~10% 甲醇;4.0~5.0 min,10% 甲醇;流速 0.3 mL/min;进样量 1 μL;柱温 35 ℃。

1.2.3 质谱条件 离子化模式为电喷雾离子源;扫描方式为多反应监测(MRM)正离子模式;毛细管电压 4 000 V;雾化温度 320 ℃;离子对、碰撞能量及碎裂电压等参数见表 1。

表 1 西布曲明质谱参数[†]

Table 1 Ms parameters of sibutramine

母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV	碎裂电压/V
280.212	125.042 [*]	25.26	41
280.212	139.042	15.15	41

[†] * 表示定量离子。

2 结果与分析

2.1 不确定度数学模型^[9]:

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1\,000} \times f, \tag{1}$$

式中:

X——样品中西布曲明含量,μg/g;

c——根据标准曲线计算所得样品溶液中西布曲明质量浓度,ng/mL;

V——样品定容体积,mL;

m——样品质量,g;

f——稀释倍数;

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{(3.58 \times 10^{-3})^2 + (3.58 \times 10^{-3})^2 + (5.27 \times 10^{-3})^2} = 7.31 \times 10^{-3}.$$

表 2 玻璃量器引入的不确定度
Table 2 Uncertainty of glass conainer

玻璃量器	最大允许 误差/mL	校准产生的相对 标准不确定度	试验温度变化产生的 相对标准不确定度	合成相对标 准不确定度
10 mL 容量瓶	±0.020	1.16×10 ⁻³	3.39×10 ⁻³	3.58×10 ⁻³
1 mL 移液管	±0.007	4.04×10 ⁻³	3.39×10 ⁻³	5.27×10 ⁻³

1 000——换算因子。

2.2 不确定度来源分析

由图 1 可知,西布曲明测量不确定度主要由标准物质溶液配制、样品称量、样品定容、标准曲线拟合、样品测量重复性(仪器性能、人员操作、随机误差)等引起的不确定度^[10-12]。

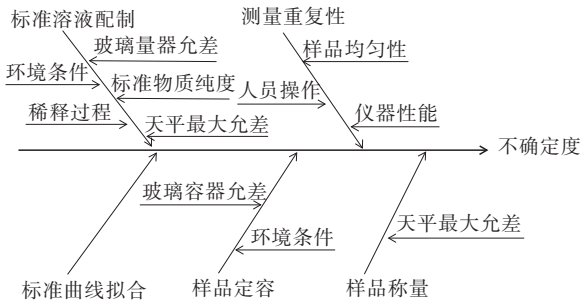


图 1 不确定度来源

Figure 1 Sources of uncertainty

2.3 不确定度的评定

2.3.1 样品称量过程引入的不确定度 *u_{rel}(m)* 使用电子天平(ME204 型)称取样品,校准证书显示分度值为 0.1 mg,称样量为 0~50 g 时,最大允许误差为±0.000 5 g,按均匀分布 *k*=√3,则一次称量过程引入的标准不确定度为:

$$u(m) = \frac{0.000\,5}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-4} \text{ g}.$$

称取 1 g 样品于烧杯中,需使用两次电子天平,则样品称量过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{\sqrt{2} \times 2.89 \times 10^{-4}}{1} = 4.09 \times 10^{-4}.$$

2.3.2 样品定容和稀释过程引入的不确定度 *u_{rel}(V)* 样品定容和稀释过程使用玻璃量器均为 A 级,根据 JJG 196—2006 规定的偏差要求,玻璃量器引入的相对标准不确定度如表 2 所示,样品定容、稀释过程使用 10 mL 容量瓶两次,1 mL 移液管一次,则样品定容和稀释过程引入的相对标准不确定度为:

2.3.3 标准物质工作溶液配制过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C_s)$

(1) 标准物质纯度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(P)$: 试验采用的盐酸西布曲明标准物质纯度为 99.9%, 假定其纯度为 $(99.9 \pm 0.1)\%$, 按均匀分布 $k=\sqrt{3}$, 则盐酸西布曲明标准物质纯度引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(P) = \frac{0.1\%}{\sqrt{3} \times 99.9\%} = 5.78 \times 10^{-4}.$$

(2) 标准物质称量过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(m_s)$: 使用天平(XPE205TDR 型)称取标准物质 0.011 52 g, 校准证书显示出分度值为 0.01 mg, 称样量为 0~5 g 时, 最大允许误差为 $\pm 0.000 05$ g, 按均匀分布 $k=\sqrt{3}$, 则标准物质称量过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m_s) = \frac{0.000 05}{\sqrt{3} \times 0.011 52} = 2.51 \times 10^{-3}.$$

(3) 标准储备溶液定容用玻璃量器引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_s)$: 根据玻璃量器检定规程, 标准储备液定容使用的 10 mL A 级容量瓶允差为 ± 0.020 mL, 按均匀分布 $k=\sqrt{3}$, 则标准储备溶液定容使用的量器引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_s) = \frac{0.020}{\sqrt{3} \times 10} = 1.16 \times 10^{-3}.$$

(4) 试验温度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(T_s)$: 容量瓶校准在 20 °C 下进行, 环境温度一般波动范围控制在 ± 5 °C, 20 °C 时甲醇和玻璃的体积膨胀系数分别为 1.2×10^{-3} , $2.5 \times 10^{-5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 按均匀分布 $k=\sqrt{3}$, 则试验温度引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(T_s) = \frac{(1.2 \times 10^{-3} - 2.5 \times 10^{-5}) \times 10 \times 5}{\sqrt{3} \times 10} = 3.39 \times 10^{-3}.$$

(5) 稀释过程引入的不确定度: 用标准储备溶液稀释配制浓度为 24.32, 48.65, 72.97, 97.29, 121.61 ng/mL 的西布曲明标准工作溶液, 用最小二乘法拟合标准工作曲线时, 与仪器测定峰面积引入的不确定度相比, 逐级稀释引入的不确定度可忽略不计。

因此, 标准物质工作溶液配制过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C_s) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(P) + u_{\text{rel}}^2(m_s) + u_{\text{rel}}^2(V_s) + u_{\text{rel}}^2(T_s)} = 5.05 \times 10^{-3}.$$

2.3.4 标准工作曲线拟合引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(S)$ 取 2.2.3(5) 中 5 种浓度标准工作溶液分别测定 3 次, 测得峰面积如表 3 所示。标准工作曲线回归方程为 $A=32 657C-57 643$ 。

表 3 标准物质工作溶液峰面积

Table 3 Peak area of standard solutions

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定次数			平均峰面积
	1	2	3	
24.32	719 037	703 278	718 497	713 604
48.65	1 535 556	1 517 163	1 535 753	1 529 491
72.97	2 354 547	2 337 156	2 332 526	2 341 410
97.29	3 195 084	3 182 425	3 174 916	3 184 142
121.61	3 829 065	3 861 327	3 882 639	3 857 677

样品重复测定 6 次, 峰面积代入线性回归方程计算可得样品溶液中西布曲明浓度分别为 70.936, 71.597, 70.269, 69.255, 70.574, 69.494 ng/mL, 平均浓度 $c_{\text{样}} = 70.35$ ng/mL, 最小二乘法拟合标准工作曲线过程所引入的标准不确定度为:

$$u(S) = \frac{S_A}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(c_{\text{样}} - \bar{c})^2}{S_c}}, \quad (2)$$

$$S_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (a + bc_i)]^2}{n - 2}}, \quad (3)$$

$$\bar{c} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i}{n}, \quad (4)$$

$$S_c = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2, \quad (5)$$

式中:

S_A ——标准工作溶液测得峰面积残差的标准偏差;

$\bar{c}$ ——标准工作溶液浓度的平均值;

S_c ——标准工作溶液浓度残差的平方和;

n ——标准工作溶液的测定次数, 此处取 15;

P ——样品溶液测定次数, 此处取 6。

因此, 由标准工作曲线拟合过程所引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(S) = \frac{u(S)}{c_{\text{样}}} = 9.54 \times 10^{-3}.$$

2.3.5 重复性测定引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$ 样品重复

测定 6 次所得西布曲明含量见表 4。重复性测定引入的不确定度属于 A 类,应用贝塞尔法评定。此不确定度结果包含人员操作、仪器性能、样品均匀性、随机误差等引入的不确定度。

$$\text{重复性标准偏差: } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.088\ 38;$$

$$\text{重复性不确定度: } u(R) = \frac{S}{\sqrt{n}} = 0.036\ 08;$$

$$\text{则相对标准测量重复性不确定度为: } u_{\text{rel}}(R) = \frac{u(R)}{\bar{x}} = 5.12 \times 10^{-3}.$$

表 4 保健食品中西布曲明重复性测定结果

Table 4 Repeatability test results of sibutramine in health foods ($n=6$)

序号	含量	序号	含量
1	7.094	5	7.057
2	7.160	6	6.949
3	7.027		
4	6.926	平均值	7.040

2.4 合成标准不确定度及扩展不确定度

液相色谱串联质谱法测定保健食品中西布曲明不确定度分量汇总如表 5 所示。

表 5 不确定度分量测量结果

Table 5 Results of uncertainty components

不确定度来源	不确定度类型	相对标准不确定度
标准物质溶液配制 $u_{\text{rel}}(C_s)$	B	5.05×10^{-3}
标准曲线拟合 $u_{\text{rel}}(S)$	B	9.54×10^{-3}
样品称量 $u_{\text{rel}}(m)$	B	4.09×10^{-4}
样品定容 $u_{\text{rel}}(V)$	B	7.31×10^{-3}
重复性测定 $u_{\text{rel}}(R)$	A	5.12×10^{-3}

$$\text{合成相对标准不确定度}^{[13-15]} \text{ 为: } u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(C_s) + u_{\text{rel}}^2(S) + u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V) + u_{\text{rel}}^2(R)} = 0.014\ 0.$$

保健食品中西布曲明含量为 $7.04\ \mu\text{g/g}$, 则合成标准不确定度为: $u(X) = 0.098\ 6\ \mu\text{g/g}$ 。

取 $k=2$ (置信概率 95%), 则测量结果的扩展不确定度为: $U = 2u(x) = 0.197\ \text{g/kg}$ 。

2.5 不确定度结果

根据 BJS 201701《食品中西布曲明等化合物的测定》测定, 保健食品中西布曲明含量为: $(7.04 \pm 0.197)\ \mu\text{g/g}$, $k=2$ 。

3 结论

研究对液相色谱串联质谱法测定保健食品中西布曲明含量的不确定度进行了量化分析。结果表明, 依据 BJS 201701《食品中西布曲明等化合物的测定》测定西布曲明含量时, 标准曲线拟合所产生的不确定度最大, 而样品称量引入的不确定最小; 标准物质溶液配制和样品定容过程中温度对玻璃量具的影响很大。因此, 在日常检测过程中, 应特别注意通过仪器性能的维护保养、选取精度高的玻璃量具、加强对试验温度的控制、规范人员操作等多种方式保证检测结果的准确性。

参考文献

- [1] 李铮, 佟旭光. 西布曲明的不良反应研究进展[J]. 首都医药, 2011, 18(14): 42-43.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 关于西布曲明的最新国际安全性信息: 摘录[J]. 中国社区医师, 2010, 26(15): 8.
- [3] 魏艳红. 关于盐酸西布曲明安全审查的早期报告[J]. 药品评价, 2010, 7(2): 29.
- [4] 钟凯. 网络假劣药品泛滥 小心中招[N]. 健康报, 2017-07-21 (004).
- [5] 龙敏飞. 多管齐下堵住“网红药”漏洞[N]. 中国商报, 2018-06-12(P02).
- [6] 郑毅, 曾峰. 曝上亿假减肥药黑幕: 每粒成本几分钱[J]. 人民之友, 2017(10): 46-47.
- [7] 杨娟, 杨晓云, 钟听, 等. 测量不确定度在食品检验检测中的应用及研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019(18): 93-95.
- [8] 师源, 郭家琪, 朱天钧, 等. 氢化物发生原子荧光光谱法测定绿豆中砷的测量不确定度评定[J]. 分析仪器, 2018(6): 112-116.
- [9] 倪育才. 测量不确定度理解与应用(一): 如何建立数学模型[J]. 中国计量, 2004(7): 72-74.
- [10] 欧阳丽, 汪辉, 何翊, 等. UPLC-MS/MS 测定猪肝中五氯酚残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 84-88.
- [11] 卫星, 李小红, 董曼曼, 等. LC-MS/MS 法测定火锅食品中 5 种罂粟壳生物碱的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 77-82, 154.
- [12] 肖利龙, 花锦. 高效液相色谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 结果不确定度的评定[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 79-81, 150.
- [13] 王赛楠. 高效液相色谱法测定水果罐头中阿斯巴甜的不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 734-739.
- [14] 黄坤, 王会霞, 范小龙, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定炒货中组胺含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 64-68, 72.
- [15] 程福安, 章家岩, 冯旭刚, 等. 基于灰色模型的蔬菜农药残留量不确定度评定[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 98-102.