

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

Evaluation of uncertainty in determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

施元旭

张水锋

潘项捷

冯婷婷

王璐璐

SHI Yuan-xu ZHANG Shui-feng PAN Xiang-jie FENG Ting-ting WANG Lu-lu

(浙江方圆检测集团股份有限公司, 浙江 杭州 310018)

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

摘要:利用超高效液相色谱—串联质谱法测定豆芽中恩诺沙星、环丙沙星的残留量,并根据建立的数学模型评定该方法的不确定度的各分量。样品用0.1%甲酸—乙腈提取,经prime HLB固相小柱净化,超高效液相色谱—串联质谱测定,内标法定量。评定结果表明,标准曲线拟合和标准溶液配置所产生的的不确定度分量最大。当豆芽中恩诺沙星含量为8.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,其扩展不确定度为1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$),环丙沙星含量为11.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,其扩展不确定度为2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$)。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱法;恩诺沙星;环丙沙星;不确定度;豆芽

Abstract: A method for the determination of trace-enrofloxacin and ciprofloxacin in bean sprouts by using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established. The mathematical model was established and used to evaluate the uncertainty components of this method. The sample was extracted with 0.1% acid acetonitrile directly, and purified by prime HLB (SPE), then analyzed by UPLC-MS/MS. The results showed that the main sources of uncertainty arose from the standard curve fitting and standard solution. The expanded uncertainty was 1.5 and 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for enrofloxacin and ciprofloxacin contents of 8.6 and 11.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in bean sprouts ($k=2$), respectively.

Keywords: UPLC-MS/MS; enrofloxacin; ciprofloxacin; uncertainty; bean sprout

豆芽品种丰富,营养全面,深受百姓喜爱。但豆芽需要在湿度较高的环境中才能发芽^[1],而高湿度的环境又容易造成豆芽的根部溃烂腐败。同时,不良商家为了追求豆芽的生产速率和豆芽的外表品质,会在豆芽的生长过程中非法添加抗生素类药物^[2-3]、杀菌剂^[4-5]等对人体有害的物质,使得“毒豆芽”的问题层出不穷。如喷洒恩诺沙星和环丙沙星药剂,其主要目的是为了防止根部腐烂。从食品安全角度来看,豆芽中残留的恩诺沙星和环丙沙星会对人体产生一定的危害,长期使用将对人体造成不可逆转的伤害^[6-8]。

恩诺沙星和环丙沙星属于化学合成的喹诺酮类抗菌药物,具有光谱抗菌活性,对革兰氏阴性菌有很强的杀灭作用^[9-11]。但长期食用有恩诺沙星和环丙沙星残留的豆芽,会导致人体的中枢神经系统出现严重的功能性疾病。严重时,可使人出现肌无力或呼吸肌无力进而危害生命,且还具有一定的遗传性和致癌性^[12]。

评定测量结果的不确定度可以保证检测结果更加准确,同时,通过不确定度的评价也可以判定试验结果质量的高低。因此,不确定度的评价是实验室质量体系的重要组成部分^[13-15]。目前,较多文献^[16-18]报道研究豆芽中有恩诺沙星和环丙沙星的检出,但中国还未制定豆芽中恩诺沙星和环丙沙星残留量检测的国家标准或行业标准。试验拟采用酸化乙腈提取,过prime HLB柱净化,氮吹浓缩前处理方法,应用液相色谱—串联质谱技术对豆芽中恩诺沙星和环丙沙星的残留量进行测定。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》评定豆芽中恩诺沙星和环丙沙星残留量检测的不确定度,有助于为豆芽品质评估提供依据。

作者简介:施元旭(1990—),女,浙江方圆检测集团股份有限公司工程师,硕士。E-mail:346150774@qq.com

收稿日期:2020-04-23

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

豆芽:市售;
恩诺沙星、环丙沙星:德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;
恩诺沙星-D₅、环丙沙星-D₈:北京 Bepure 公司;
乙腈、甲醇:色谱纯,德国 Meker 公司;
甲酸:色谱纯,美国 ROE Scientific 公司;
超高效液相色谱—串联质谱仪:Agilent 1290-AB Sciex 5500 型,美国 AB Sciex 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 称取 5.0 g 豆芽于 50 mL 高速离心管中,准确加入内标工作液,涡旋混合均匀。加入 10 g 氯化钠,涡旋混匀,再加入 8 mL 乙腈,20 μL 甲酸,涡旋混合 1 min,振荡提取 10 min。高速冷冻离心后,取上清液过 prime HLB 小柱,并直接接取流出液。样品过柱后,用 2 mL 乙腈淋洗小柱。接取流出液在 40 ℃ 条件下 N₂ 吹干,1.0 mL 初始流动相定容,过膜上机测试。

1.2.2 液相色谱条件 色谱柱:Aglient RRHD SB-C₁₈ (2.1 mm×100 mm,1.8 μm);柱温 35 ℃;流动相 A:乙腈;流动相 B:0.1% 甲酸水;流速 0.2 mL/min;进样量 5 μL;液相色谱梯度洗脱程序:0~1 min,90% B;1.0~3.0 min,90%~10% B;3.0~3.5 min,10% B;3.5~5.0 min,10%~90% B;5.0~6.0 min,90% B。

1.2.3 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源:正离子模式;扫描模式:多反应检测(MRM);喷雾电压 5.0 kV;脱溶剂气温度 550 ℃;气帘气压力 241 kPa;雾化气压力 345 kPa。其他参数见表 1。

表 1 恩诺沙星和环丙沙星的主要质谱参数[†]
Table 1 Main mass spectrometric parameters for enrofloxacin and ciprofloxacin

化合物	母离子	子离子	去簇电压	碰撞能量
恩诺沙星	360.3	316.3 *	113	26
		245.2	113	39
恩诺沙星-D ₅	365.2	245.2	113	39
		314.2 *	150	26
环丙沙星	332.0	231.0	150	33
		322.2	150	32

[†] * 为定量离子。

1.2.4 数学模型

$$X = \frac{C \times V}{m \times f_r} \times f_Q,$$
 (1)

式中:
X——样品中恩诺沙星或环丙沙星的含量,μg/kg;
C——样品中恩诺沙星或环丙沙星测定浓度,μg/L;
V——提取液的定容体积,mL;
m——样品质量,g;
f_r——待测物质的回收率,%;
f_Q——液相色谱串联质谱校正影响因子。

2 结果与分析

2.1 样品的不确定度来源

根据试验检测步骤和建立的数学模型,超高效液相色谱—串联质谱法测定豆芽中恩诺沙星和环丙沙星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 称样量引入的不确定度 u_{rel}(m);③ 样品定容引入的不确定度 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}(f_r);⑦ 仪器分析的不确定度 u_{rel}(f_Q)。

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) 包括样品制备过程的均匀性、样品提取液和定溶液的浓度和纯度、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),用液相色谱串联质谱测定,结果见表 2。用贝塞尔公式[式(2)~(4)]计算,单个测得值的标准偏差、标准不确定度及相对标准不确定度。

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

$$u(X) = \frac{s(X)}{\sqrt{n}},$$
 (3)

$$u_{rel}(X) = \frac{u(X)}{\bar{X}}.$$
 (4)

2.2.2 样品称量引入的不确定度 u_{rel}(m) 利用精确至 0.01 g 的天平称取豆芽 5.00 g,天平校准证书说明天平最大允许误差为±0.05 g,取均匀分布,u(m)=0.05/√3=0.028 87 g,u_{rel}(m)=0.028 87/5=0.005 774。

表 2 测试过程随机效应引入的不确定度 u_{rel}(X) 计算结果

Table 2 Repeatability relative standard uncertainty u_{rel}(X) calculation results

待测物	测定值/(μg·kg ⁻¹)						平均值/ (μg·kg ⁻¹)	s(X)	u _{rel} (X)
	1	2	3	4	5	6			
恩诺沙星	8.668	8.807	8.490	8.479	8.533	8.612	8.598	0.125 6	0.005 962
环丙沙星	10.313	11.394	11.598	10.895	10.665	10.913	10.963	0.470 6	0.017 530

2.2.3 样品定容引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$ 样品定容使用 1 mL 可调移液枪,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 ± 0.010 mL,满足均匀分布, $k=\sqrt{3}$, 不确定度 $u(V)=0.010/\sqrt{3}=0.005\ 774$ mL, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)=0.005\ 774/1=0.005\ 774$ 。

2.2.4 标准曲线拟合引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{curve})$ 配制 5 个不同质量浓度的标准溶液绘制标准曲线,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 ($\mu\text{g/L}$) 为横坐标,以标准溶液外标峰面积值 ($A_{\text{外标}}$) 与内标峰面积值 ($A_{\text{内标}}$) 的比值为纵坐标,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 3。

分别重复测定样品溶液 6 次 ($p=6$), 计算线性回归方程导致 x_0 的标准不确定度

$$u(\text{curve}) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}}, \quad (5)$$

$$u_{\text{rel}}(\text{curve}) = u(\text{curve}) / x_0, \quad (6)$$

式中:

S ——标准曲线的标准偏差;

x_0 ——样品溶液平均浓度, $\mu\text{g/L}$;

b ——斜率;

a ——截距;

$\bar{x}$ ——标准溶液浓度的平均值, $\mu\text{g/L}$;

n ——测试标准溶液的试验总次数(每个标准溶液点

测试 3 次 $\times$ 5 个不同质量浓度的点), $n=15$ 。

计算结果见表 4。

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恩诺沙星、环丙沙星标准品的纯度、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:恩诺沙星的纯度为 99.9%,标准不确定度为 1.25%,取包含因子 $k=2$,其相对标准不确定度 $u(P_1)=1.25\%/2=0.006\ 25$, $u_{\text{rel}}(P_1)=0.006\ 25/0.999=0.006\ 256$ 。环丙沙星的纯度为 92.31%,标准不确定度为 0.66%,取包含因子 $k=2$,相对标准不确定度 $u(P_2)=0.66\%/2=0.003\ 3$, $u_{\text{rel}}(P_2)=0.003\ 3/0.923\ 1=0.003\ 575$ 。

恩诺沙星内标的纯度为 95.3%,标准不确定度为 1%,取包含因子 $k=2$,相对标准不确定度 $u(P_3)=1\%/2=0.005$, $u_{\text{rel}}(P_3)=0.005/0.953=0.005\ 247$ 。环丙沙星内标的纯度为 $(94.8\pm 1.0)\%$,标准不确定度为 1%,取包含因子 $k=2$,相对标准不确定度 $u(P_4)=1\%/2=0.005$, $u_{\text{rel}}(P_4)=0.005/0.948=0.005\ 274$ 。

恩诺沙星标准物质纯度和内标物质纯度合成相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(P_{\text{恩}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(P_1)^2 + u_{\text{rel}}(P_3)^2} = 0.008\ 165。$$

环丙沙星标准物质纯度和内标物质纯度合成相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(P_{\text{环}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(P_2)^2 + u_{\text{rel}}(P_4)^2} = 0.006\ 371。$$

(2) 称量标准品引入的不确定度:用电子天平精确称

表 3 恩诺沙星和环丙沙星残留量线性回归方程及相关系数
Table 3 Regression equations of enrofloxacin and ciprofloxacin

待测物	$X_i /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$A_{\text{外标}}/A_{\text{内标}}$			线性方程	相关系数 R^2
		1	2	3		
恩诺沙星	10	0.377	0.370	0.379	$A=0.024\ 35X+0.112\ 05$	0.999\ 7
	20	0.614	0.599	0.610		
	50	1.228	1.231	1.239		
	150	3.917	3.935	3.935		
	200	4.888	4.861	4.853		
环丙沙星	10	0.100	0.103	0.099	$A=0.007\ 47X+0.023\ 70$	0.999\ 6
	20	0.201	0.212	0.202		
	50	0.497	0.511	0.502		
	150	1.172	1.169	1.181		
	200	1.494	1.496	1.502		

表 4 $u_{\text{rel}}(\text{curve})$ 计算结果
Table 4 $u_{\text{rel}}(\text{curve})$ caculation results

待测物	$x_0 / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$\bar{x} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	S	b	a	$u_{\text{rel}}(\text{curve})$
恩诺沙星	42.990	86.0	0.107\ 9	0.024\ 35	0.998\ 70	0.056\ 29
环丙沙星	54.815	86.0	0.056\ 2	0.007\ 47	0.023\ 70	0.070\ 98

量恩诺沙星准物质 10 mg, 电子天平校准证书表明该天平最大允许称量误差为 ± 0.05 mg, 为均匀分布, 测量不确定度 $u(c_{\text{恩}1}) = 0.05/\sqrt{3} = 0.02887$ mg, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}1}) = 0.02887/10 = 0.002887$ 。称取环丙沙星 10.84 mg, 测量不确定度 $u(c_{\text{环}1}) = 0.05/\sqrt{3} = 0.02887$ mg, 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{\text{环}1}) = 0.02887/10.84 = 0.002663$ 。

内标物质均为 10 mg, 一次性溶解, 不存在由于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 ± 0.020 mL, 服从三角分布, 由此引入的不确定度为: $u(c_{21}) = 0.020/\sqrt{6} = 0.008165$ mL, $u_{\text{rel}}(c_{21}) = 0.008165/10 = 0.0008165$ 。

根据 JJG 196—2006《常用玻璃量具》规定, 10 mL 容量瓶检定是在 20 °C 环境条件下进行的, 试验在 (20 ± 5) °C 环境条件下操作, 甲醇的体积膨胀系数为 $1.1 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, $\Delta V = 10 \times 1.1 \times 10^{-3} \times 5 = 0.055$ mL, 服从均匀分布, $u(V_t) = 0.055/\sqrt{3} = 0.0318$ mL, $u_{\text{rel}}(V_t) = 0.0318/10 = 0.00318$ 。

因此, 分别定容恩诺沙星、环丙沙星、恩诺沙星内标和环丙沙星内标的合成相对不确定度为: $u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}2}) = \sqrt{2u_{\text{rel}}(c_{21})^2 + 2u_{\text{rel}}(V_t)^2} = 0.004643$; $u_{\text{rel}}(c_{\text{环}2}) = 0.004643$ 。

(4) 标准溶液稀释引入的不确定度: 取 100 μL 浓度为 1.0 mg/mL 的恩诺沙星标准溶液于 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 $\pm 2.0\%$, 服从均匀分布, 引入的不确定度为: $u(c_{31}) = 100 \times 2.0\%/\sqrt{3} = 1.1547$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{31}) = 1.1547/100 = 0.01155$ 。

根据 JJG 196—2006《常用玻璃量具鉴定规程》, 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 $u(c_{32}) = 0.020/\sqrt{6} = 0.008165$ mL, $u_{\text{rel}}(c_{32}) = 0.008165/10 = 0.0008165$ 。定容液体积膨胀引入的不确定度计算方式同 2.2.5(3), $u(V_{2t}) = 0.055/\sqrt{3} = 0.03175$ mL, $u_{\text{rel}}(V_{2t}) = 0.03175/10 = 0.003175$ 。

恩诺沙星标准溶液稀释引入的合成相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}3}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_{31})^2 + u_{\text{rel}}(V_{2t})^2 + u_{\text{rel}}(c_{32})^2} = 0.01201。$$

同理, 环丙沙星标准溶液稀释引入的合成相对不确

定度为: $u_{\text{rel}}(c_{\text{环}3}) = 0.01201$ 。

取 100 μL 浓度为 1.0 mg/mL 的恩诺沙星内标溶液于 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 $\pm 2.0\%$, 服从均匀分布, 引入的不确定度为: $u(c_{51}) = 100 \times 2.0\%/\sqrt{3} = 1.1547$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{51}) = 1.1547/100 = 0.01155$ 。

同上, 用 100 mL 玻璃容量瓶定容恩诺沙星内标引入的不确定度 $u(c_{52}) = 0.1/\sqrt{6} = 0.04082$ mL, $u_{\text{rel}}(c_{52}) = 0.04082/100 = 0.0004082$ 。定容液体积膨胀不确定度 $u(V_{3t}) = 0.55/\sqrt{3} = 0.318$ mL, $u_{\text{rel}}(V_{3t}) = 0.318/100 = 0.00318$ 。

恩诺沙星内标溶液稀释引入的合成相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}4}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_{51})^2 + u_{\text{rel}}(V_{3t})^2 + u_{\text{rel}}(c_{52})^2} = 0.01199。$$

同理, 环丙沙星内标溶液稀释引入的合成相对不确定度为: $u_{\text{rel}}(c_{\text{环}4}) = 0.01199$ 。

(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 的恩诺沙星标准溶液, 甲醇定容。用到 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误差分别为 $\pm 8.0\%$, $\pm 4.0\%$, $\pm 3.0\%$, $\pm 1.5\%$, $\pm 1.5\%$, 服从均匀分布, 由移液枪引入的不确定度分别为: $u(c_{71}) = 10 \times 8.0\%/\sqrt{3} = 0.4619$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{71}) = 0.4619/10 = 0.04619$; $u(c_{72}) = 20 \times 4.0\%/\sqrt{3} = 0.4619$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{72}) = 0.4619/20 = 0.02310$; $u(c_{73}) = 50 \times 3.0\%/\sqrt{3} = 0.8660$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{73}) = 0.8660/50 = 0.01732$; $u(c_{74}) = 150 \times 1.5\%/\sqrt{3} = 1.2990$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{74}) = 1.2990/150 = 0.00866$; $u(c_{75}) = 200 \times 1.5\%/\sqrt{3} = 1.7321$ μL , $u_{\text{rel}}(c_{75}) = 1.7321/200 = 0.008660$ 。

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

10 mL 容量瓶定容引入的不确定度, 可根据 2.2.5(3) 的计算方法, 得到的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{10\text{mL}}) = 0.003283$ 。

配制恩诺沙星标准曲线引入的合成相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}5}) = [u_{\text{rel}}(c_{71})^2 + u_{\text{rel}}(c_{72})^2 + u_{\text{rel}}(c_{73})^2 + u_{\text{rel}}(c_{74})^2 + u_{\text{rel}}(c_{75})^2 + 5u_{\text{rel}}(c_{10\text{mL}})^2]^{\frac{1}{2}} = 0.05631。$$

样品中添加恩诺沙星内标引入的合成相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}6}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(c_{76})^2 + u_{\text{rel}}(c_{10\text{mL}})^2} = 0.01201。$$

因此,配制环丙沙星标准曲线引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{\text{环丙}})=0.056\ 31$;样品中添加环丙沙星内标引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(c_{\text{环丙}})=0.012\ 01$ 。

标准曲线稀配制过程和样品中添加内标引入的合成相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{恩}}) = [u_{\text{rel}}(c_{\text{恩1}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{\text{恩2}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{\text{恩3}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{\text{恩4}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{\text{恩5}})^2 + u_{\text{rel}}(c_{\text{恩6}})^2 + u_{\text{rel}}(P_{\text{恩}})^2]^{\frac{1}{2}} = 0.060\ 90;$$

$$u_{\text{rel}}(c_{\text{环}}) = 0.060\ 67。$$

2.2.6 回收率测试过程随机效应引入的不确定度

$u_{\text{rel}}(f_r)$ 由于目标化合物从样品基质中不能完全提取

出来,加上提取、氮吹过程的损失导致了较大的不确定度,对样品前处理产生的不确定度用回收率方法来计算。

按照方法的要求对同一个样品重复加标 6 次($n=6$),上机测定恩诺沙星和环丙沙星的加标回收率,结果见表 5。根据式(7)计算得到 6 次试验结果的标准偏差 $s(X)$,式(8)计算得到回收率测试过程中引入的相对不确定度。

$$s(X) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}, \tag{7}$$

$$u_{\text{rel}}(f_r) = u(f_r)/\bar{X}。 \tag{8}$$

表 5 $u_{\text{rel}}(f_r)$ 计算结果
Table 5 $u_{\text{rel}}(f_r)$ caculation results

待测物	回收率 $X_i/\%$						平均值 $\bar{X}/\%$	$s(X)$	$u(f_r)$	$u_{\text{rel}}(f_r)$
	1	2	3	4	5	6				
恩诺沙星	86.68	88.07	84.90	84.79	85.33	86.12	85.98	1.255 6	1.255 6	0.014 60
环丙沙星	103.13	113.94	115.98	108.95	106.65	109.13	109.63	4.706 2	4.706 2	0.037 18

2.2.7 检测仪器引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(f_Q)$ 由《超高效液相色谱—串联质谱 仪器校准证书》知, $u_{\text{rel}}(f_Q)=2\%$ 。

2.3 合成不确定度

恩诺沙星和环丙沙星的相对不确定度分量见表 6,若不考虑各不确定度的相关性,则其合成不确定度按式(9) 计算。

$$u_{\text{rel}}(W) = [u_{\text{rel}}^2(X) + u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V) + u_{\text{rel}}^2(\text{curve}) + u_{\text{rel}}^2(c) + u_{\text{rel}}^2(f_r) + u_{\text{rel}}^2(f_Q)]^{\frac{1}{2}}。 \tag{9}$$

通过式(9)求得: $u_{\text{rel}}(W_{\text{恩}})=0.087\ 08$; $u_{\text{rel}}(W_{\text{环}})=0.104\ 2$ 。

2.4 扩展不确定度及结果表示

根据 CNAS-GL006:2018《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 $U=u_{\text{rel}}(W) \times 2 \times X$,由此得到豆芽中恩诺沙星和环丙沙星的测量结果,见表 7。

表 7 豆芽中恩诺沙星和环丙沙星不确定度评定结果
Table 7 Uncertainty evaluation for enrofloxacin and ciprofloxacin in bean sprouts

待测物	实测值 $X/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	合成相对不确定度	扩展不确定度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	检测结果/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
恩诺沙星	8.598	0.087 08	1.497	8.6 ± 1.5
环丙沙星	10.963	0.104 2	2.284	11.0 ± 2.3

3 结论

试验以豆芽为研究对象,采用 0.1%酸化乙腈提取,prime HLB 固相萃取小柱净化,应用超高效液相色谱—串联质谱法对豆芽中恩诺沙星和环丙沙星的残留量进行测定。根据数学模型,对豆芽中恩诺沙星和环丙沙星残留量的不确定度各分量进行评定,评定结果表明,测定结果的不确定度最主要来源于标准曲线的拟合和标准溶液的配制过程,其次是仪器的影响和回收率,其他因素的影响较小。因此,试验过程中,需要操作人员增加试验的平行次数以及标准溶液的测定次数,维护好检测仪器的性能,使其有足够的灵敏度和精密度,定期做好仪器期间核查和校准检定,减少因仪器引入的不确定度。定期对恩诺沙星和环丙沙星的标准溶液期间核查,保证标准物质的可靠性,从而保证试验结果的准确可靠。同样,称量样品时,可考虑选取精度更高的电子天平,或增加称样量,来减少称样过程引入的不确定度,从而提高试验结果的准确度。

表 6 恩诺沙星和环丙沙星相对不确定度分量

Table 6 List of relative uncertainty components for enrofloxacin and ciprofloxacin

不确定 度分量	不确定度来源	相对标准不确定度	
		恩诺沙星	环丙沙星
$u_{\text{rel}}(X)$	测试过程随机效应	0.005 962	0.017 53
$u_{\text{rel}}(m)$	样品称量	0.005 774	0.005 774
$u_{\text{rel}}(V)$	样品定容	0.005 774	0.005 774
$u_{\text{rel}}(\text{curve})$	标准曲线拟合	0.056 29	0.070 98
$u_{\text{rel}}(c)$	标准溶液配制	0.060 82	0.060 60
$u_{\text{rel}}(f_r, c)$	回收率测试过程的随机效应	0.014 60	0.037 18
$u_{\text{rel}}(f_Q)$	检测仪器校准	0.02	0.02

参考文献

- [1] 江苏省苏州质量技术监督局. 豆芽工厂化生产技术规程: DB3205/T 206—2011[S]. 苏州: [出版者不详], 2011: 2-3.
- [2] 程盛华. 豆芽中三类有害物残留检测方法的研究[D]. 海南: 海南大学, 2015: 2-4.
- [3] 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.
- [4] SHI Zhen, CHEN Dan, CHEN Tian-tian, et al. In vivo analysis of two new fungicides in mung bean sprouts by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 688-695.
- [5] 袁京群, 吴筱丹, 李士敏, 等. 超声辅助提取—高效液相色谱—串联质谱法测定豆芽中福美双的残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(5): 569-571.
- [6] 张颖颖, 李莹莹. 超高效液相色谱—串联质谱测定猪肉中 16 种喹诺酮类药物残留量[J]. 肉类研究, 2016, 30(5): 36-41.
- [7] 刘少颖, 黄希汇, 胡柯君, 等. 杭州市动物性食品中喹诺酮类抗生素残留水平及安全性评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(18): 2 280-2 285.
- [8] MARGARITA H, CARME A, FRANESC B, et al. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 772(1): 163-172.
- [9] MA Li-yan, ZHANG Hong-yan, XU Wen-tao, et al. Simultaneous determination of 15 plant growth regulators in bean sprout and tomato with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(3): 941-951.
- [10] 黄坤, 范小龙, 曹琦, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法快速测定禽蛋中 7 种喹诺酮类兽药残留[J]. 食品与发酵工业, 2019(16): 261-265.
- [11] 周贻兵, 李磊, 吴坤, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定鸡肝中恩诺沙星残留含量测定[J]. 现代预防医学, 2017(16): 114-117, 135.
- [12] WANG Xiao-li, GUO Tao, WEI Yun-bo, et al. Determination of quinolone antibiotic residues in human serum and urine using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Toxicology, 2019, 43(7): 579-586.
- [13] 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.
- [14] 王嘉权. 液相色谱串联质谱法测定水产品喹诺酮类药物残留的不确定度评定[J]. 广东化工, 2018, 45(12): 227-229.
- [15] YANG Meng-rui, LIU Fang, WANG Min, et al. Development of a whole liquid egg certified reference material for accurate measurement of enrofloxacin residue [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125 253.
- [16] 张宪臣, 毕洪波, 张朋杰, 等. SA-HPLC-MS/MS 法快速检测豆芽中 4 种喹诺酮类药物残留量[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 216-220.
- [17] 程志, 宿书芳, 魏莉莉, 等. 通过式固相萃取净化—液相色谱—串联质谱法测定豆芽中 10 种喹诺酮类抗生素[J]. 分析实验室, 2020, 39(2): 131-136.
- [18] 陶志成, 朱丹倩, 洛灿, 等. 豆芽中 6 种喹诺酮类抗生素药物残留量的同时测定高效液相色谱—串联质谱法测定[J]. 质量与检测, 2019(4): 41-42.
- (上接第 36 页)
- [24] ZHENG Ya-feng, WANG Qi, HUANG Ju-qing, et al. Hypoglycemic effect of dietary fibers from bamboo shoot shell: An in vitro and in vivo study[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 127(3): 120-126.
- [25] MCRORIE J W, MCKEOWN N M. Understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: An evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber [J]. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2017, 117(2): 251-264.
- [26] XUE Zi-han, MA Qi-qi, GUO Qing-wen, et al. Physicochemical and functional properties of extruded dietary fiber from mushroom Lentinula edodes residues[J]. Food Bioscience, 2019, 32: 100452.
- [27] LUO Xian-liang, WANG Qi, FANG Dong-ya, et al. Modification of insoluble dietary fibers from bamboo shoot shell: Structural characterization and functional properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1 461-1 467.
- [28] 张建利, 张正茂, 张芯蕊, 等. 不同提取方法对马铃薯膳食纤维化学组成和理化性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(11): 33-38.
- [29] BENITEZ V, REBOLLO-HERNANZ M, HERNANZ S, et al. Coffee parchment as a new dietary fiber ingredient: Functional and physiological characterization[J]. Food Research International, 2019, 122(4): 105-113.
- [30] 姚琦. 马铃薯渣膳食纤维提取、改性及应用研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2018: 35-36.
- [31] DAOU C, ZHANG Hui. Study on functional properties of physically modified dietary fibres derived from defatted rice bran[J]. Journal of Agricultural Science, 2012, 4(9): 85-97.
- [32] CESPEDES M A L, MARTINEZ BUSTOS F, KIL CHANG Y. The Effect of extruded orange pulp on enzymatic hydrolysis of starch and glucose retardation index[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(5): 684-692.