

# 同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺的不确定度评定

Uncertainty evaluation for determination of amantadine in egg by isotope dilution-UPLC-MS/MS

马 凯<sup>1</sup> 包 娜<sup>1</sup> 黄永桥<sup>2</sup> 吴新文<sup>2</sup>

MA Kai<sup>1</sup> BAO Na<sup>1</sup> HUANG Yong-qiao<sup>2</sup> WU Xin-wen<sup>2</sup>

(1. 贵州省分析测试研究院, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州省检测技术研究应用中心, 贵州 贵阳 550000)

(1. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang, Guizhou 550000, China; 2. Guizhou Provincial Detection Technology Research and Application Center, Guiyang, Guizhou 550000, China)

**摘要:**依据 SN/T 4253—2015 规定的方法, 建立数学模型, 确定同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法的不确定度来源并对其进行评定, 计算合成不确定度。结果表明: 当鸡蛋中金刚烷胺含量为 25.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时, 其扩展不确定度为 4.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $k=2$ , 95% 置信区间), 其中标准溶液配制和样品前处理过程引入的不确定度较大。

**关键词:**金刚烷胺; 超高效液相色谱—串联质谱法; 不确定度; 同位素稀释; 鸡蛋

**Abstract:** A method for the evaluation of the uncertainty of amantadine in egg by ultra-performance liquid chromatography-stable isotope dilution mass spectrometry was established. Based on SN/T 4253—2015, the mathematical models of uncertainty was established and the sources of uncertainty were analyzed and evaluated, while the components of uncertainty were composed. The results showed that the expanded uncertainty was 4.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $k=2$ , 99% confidence interval) when the content of amantadine was 25.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mainly caused by standard solution preparation and curve fitting.

**Keywords:** amantadine; UPLC-MS/MS; uncertainty; isotope dilution; egg

金刚烷胺是金刚烷的衍生物, 属于三环胺类, 是医学界公认的对流感病毒有抑制作用的抗病毒药物。为了降低畜禽的发病率, 减少经济损失, 不少养殖户将金刚烷胺

类抗病毒药物用于畜禽类流感的治疗和预防<sup>[1]</sup>, 因缺乏科学规范、安全有效的试验数据, 不合理给药会导致畜禽类产品的药物残留, 影响人类身体健康, 不利国家动物疫病防控政策的实施。美国食品药品监督管理局在 2005 年明确禁止将人类抗病毒药物用于禽畜类的防治; 在中国农业部第 560 号公告中, 金刚烷胺等抗病毒类药物, 被明确禁止用于禽类的饲养过程<sup>[2-3]</sup>。

目前, 金刚烷胺的检测方法主要有气相色谱法<sup>[4-5]</sup>、高效液相色谱法<sup>[6-7]</sup>、液质联用法<sup>[8-10]</sup>等, 液相色谱法和气相色谱法大多需要衍生, 操作繁琐, 液相色谱—串联质谱法有较高的灵敏度和高选择性, 抗干扰能力强, 在金刚烷胺的检测中应用最为广泛, 中国现行的关于动物源性食品中金刚烷胺的标准检测方法 SN/T 4253—2015 和 GB 31660.5—2019, 均采用液相色谱—串联质谱法。现阶段采用液质联用法测定动物源性食品中金刚烷胺的不确定度评定报道较少, 为衡量检测结果的可信度, 研究拟选取金刚烷胺残留风险较高的鸡蛋样品, 试验依据 SN/T 4253—2015 标准方法, 并参照现行化学分析中不确定度评定方法与要求<sup>[11-12]</sup>, 通过对同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法检测鸡蛋中金刚烷胺的不确定度进行评定, 以期提高金刚烷胺残留量测量结果的科学性, 同时为其他类型的动物源性食品中金刚烷胺测定结果的不确定度评定提供参考。

## 1 试验部分

### 1.1 主要仪器与装置

超高效液相色谱—串联质谱仪: Agilent 1290/6460 型, 美国安捷伦公司;

实验室超纯水制备系统: Milli-Q Intergra 115 型, 美国 Millipore 公司;

**基金项目:**国家重点研发计划(编号: 2017YFC1601800); 贵州省高层次创新型“千”层次人才培养项目

**作者简介:**马凯, 男, 贵州省分析测试研究院工程师, 硕士。

**通信作者:**包娜(1987—), 女, 贵州省分析测试研究院高级工程师, 硕士。E-mail: baona@gzata.cn

**收稿日期:**2021-01-02

多管旋涡混合器:UMV-2型,北京普立泰科仪器有限公司;

高速离心机:L-500型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;

电子天平:TXB622L型,日本岛津公司;

瓶口分液器:Organic型,5~50 mL,德国普兰德公司;

固相萃取装置:SPEMF12G型,深圳逗点生物技术有限公司;

旋涡混合器:XW-80A型,江苏金坛区白塔金昌实验仪器厂;

氮吹仪:N-EVAP 12型,美国 Organomation 公司。

## 1.2 耗材与试剂

甲醇、乙腈:色谱纯,美国 SUPELCO 公司;

甲酸:色谱纯,德国 Merck 公司;

乙酸铵:优级纯,山东西亚化学股份有限公司;

氨水:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;

三氯乙酸:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

MCX SPE 小柱:60 mg/3 mL,深圳逗点生物技术有限公司;

金刚烷胺(CAS:768-94-5;相对扩展不确定度5%)、金刚烷胺-d6(CAS:1219805-53-4;相对扩展不确定度5%):100.0 μg/mL,天津阿尔塔科技有限公司。

## 1.3 样品前处理方法

1.3.1 样品提取液的配制 称取 20 g 三氯乙酸,溶于 1 L 水中,混匀,量取 900 mL 配制好的三氯乙酸溶液,加入 100 mL 乙腈,混匀备用。

1.3.2 试样制备 鸡蛋样品去壳后,放入组织捣碎机均质,充分混匀,装入样品袋中,试样于-18℃以下密封保存,备用。

1.3.3 提取 称取 5 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入内标工作液,加入 1 粒陶瓷均质子,再加入 15 mL 三氯乙酸溶液,置于多管旋涡混合充分提取 5 min,然后在 4℃条件下 12 000 r/min 离心 5 min,取出上清液,用 10 mL 三氯乙酸溶液重复提取一次,离心后合并上清液至 25 mL 容量瓶中,并定容至刻度。

1.3.4 净化 固相萃取小柱依次用 3 mL 甲醇、水和 2% 甲酸活化,准确移取 5 mL 上清液,加入到已活化的小柱中,并依次用 5 mL 2% 甲酸溶液、3 mL 1% 甲酸乙腈溶液淋洗,弃去全部流出液,抽干小柱,用 4.0 mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱,45℃下氮吹至近干,准确加入 1.0 mL 甲醇-水( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:9$ ),涡旋 30 s 后,过微孔滤膜,待测。

## 1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub>柱(1.8 μm,50 mm×2.1 mm);流动相:含 0.1% 甲酸

的 2 mmol/L 乙酸铵水溶液(A),乙腈(B);梯度洗脱程序:0.0~0.5 min (10% B),0.5~2.0 min (10%~30% B),2.0~3.0 min (30%~90% B),3.0~4.5 min (90% B),4.5~5.0 min (90%~10% B),5.0~6.0 min (10% B);流速 0.3 mL/min;进样量 2 μL;柱温 40℃。

1.4.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI),正离子;扫描模式:多反应监测模式(MRM);毛细管电压 5.0 kV;雾化气压力 275 kPa;喷嘴电压 500 V;鞘气温度 350℃;鞘气流速 12 L/min;干燥气温度 350℃,干燥气流速 6 L/min;金刚烷胺和金刚烷胺-d6 质谱参数见表 1。

表 1 目标物的质谱参数<sup>†</sup>

Table 1 MS parameters for the analytes

目标物	母离子 ( $m/z$ )	子离子 ( $m/z$ )	碎裂电 压/V	碰撞能 量/eV
金刚烷胺	152.1	135.2*	80	18
		93.0	80	34
金刚烷胺-d6	158.0	141.1	80	34

<sup>†</sup> \* 为定量离子。

## 1.5 重复测定与加标回收试验

选取一阳性鸡蛋样品,按照 1.3 前处理方法对金刚烷胺含量重复测定 6 次,计算平均值并作为最终结果;用空白鸡蛋样品,分别以 5.0,10.0,20.0 μg/kg 3 个水平进行添加回收试验,每个添加水平重复测定 6 次,并计算回收率。

## 2 结果与分析

### 2.1 数学模型的建立

根据鸡蛋中金刚烷胺的前处理过程和测定原理,目标物的计算公式:

$$X = \frac{C \times V \times D \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times \frac{1}{R}, \quad (1)$$

式中:

X——样品中金刚烷胺含量,μg/kg;

C——仪器测定的金刚烷胺质量浓度,ng/mL;

V——样品定容体积,mL;

D——稀释倍数;

m——样品称样量,g;

1/R——回收率校正因子。

### 2.2 不确定度来源分析

从测量过程和数学模型,对鸡蛋中金刚烷胺含量测定的各种不确定度来源进行分析,具体如图 1 所示。

#### 2.3 各项相对标准不确定度的计算

##### 2.3.1 标准溶液配制过程中引入的不确定度分量 $u_{\text{rel}}(S)$

(1) 标准储备液引入的相对标准不确定度  $u_{\text{rel}}(S_1)$ : 金刚烷胺标准溶液在标准物质证书上的相对扩展不确定

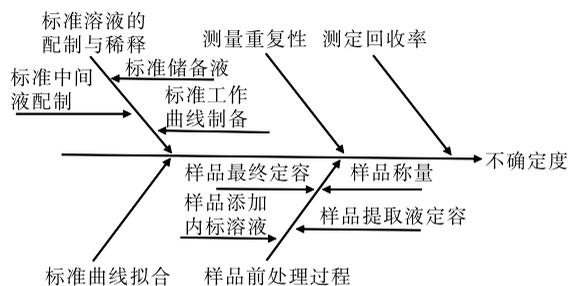


图 1 不确定度来源

Figure 1 Sources of uncertainty

度为 5%,  $k = 2$ , 置信水平为 95%, 因此相对标准不确定度:

$$u_{rel}(S_1) = \frac{0.05}{2} = 0.025.$$

(2) 标准中间液配制过程中引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(S_2)$ : 用单标线 1 mL 移液管吸取 100.0  $\mu\text{g/mL}$  金刚烷胺标准溶液 1.00 mL 于 10 mL 容量瓶(A 级)中, 用甲醇定容至刻度, 配制的标准中间储备液质量浓度为 10.0  $\mu\text{g/mL}$ ; 再用 1 mL 分度吸量管(A 级)吸取标准中间储备液 0.50 mL 于 10 mL 容量瓶(A 级)中, 用甲醇定容, 稀释成质量浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的标准使用溶液, 备用。金刚烷胺-d6 标准中间液也按照相同的稀释步骤进行配制, 得到 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的内标标准使用溶液, 备用。

试验采用的是同位素内标稀释法定量分析, 内标物浓度不参与最终测量结果的计算, 因此, 在内标物配制和稀释过程中可不考虑引入的不确定度, 只评估在标准工作曲线制备和样品前处理过程中加入内标溶液引入的不确定度。

$$u_{rel}(S_3) = \sqrt{0.046224^2 + 7 \times 0.023178^2 + 0.011720^2 + 0.007957^2 + 0.006116^2 + 0.005041^2 + 6 \times 0.002327^2} = 0.078697.$$

由各不确定度分量, 计算标准溶液配制过程引入的相对标准不确定度:

$$u_{rel}(S) = \sqrt{u_{rel}(S_1)^2 + u_{rel}(S_2)^2 + u_{rel}(S_3)^2} = 0.08349.$$

根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》, 1 mL 分度吸量管(A 级)的容量允差为  $\pm 0.08$  mL, 10 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为  $\pm 0.02$  mL, 1 mL 单标线吸量管(A 级)的容量允差为  $\pm 0.07$  mL。

实验室的实际温度变化范围为  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ , 查得  $20^\circ\text{C}$  时甲醇和玻璃容器的体积膨胀系数分别为  $1.2 \times 10^{-3}$ ,  $2.50 \times 10^{-5}^\circ\text{C}^{-1}$ , 二者相比较, 玻璃容器的膨胀系数可忽略不计, 按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ , 在标准中间液配制过程中温度波动及玻璃量器引入的不确定度见表 2。

因此, 由标准中间液稀释过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(S_2) = \frac{(S_2)}{\sqrt{0.005323^2 + 0.009868^2 + 2 \times 0.003652^2}} = 0.012345.$$

(3) 标准工作曲线制备过程引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(S_3)$ : 用 1 mL 分度吸量管(A 级)分别移取 0.50  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 再使用 1 mL 分度吸量管(A 级)向每个容量瓶中加入 0.20 mL 质量浓度为 0.50  $\mu\text{g/mL}$  内标工作液, 最终用甲醇—水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$ )定容至刻度, 得到质量浓度分别为 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 ng/mL 以及内标质量浓度为 10.0 ng/mL 的标准系列溶液。查得  $20^\circ\text{C}$  时甲醇和水的体积膨胀系数分别为  $1.2 \times 10^{-3}$ ,  $2.1 \times 10^{-4}^\circ\text{C}^{-1}$ , 试验过程中用于定容的甲醇—水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$ )溶液的体积膨胀系数为  $7.0 \times 10^{-4}^\circ\text{C}^{-1}$ , 按矩形分布处理, 相关的玻璃量器、吸量管及温度波动引入的不确定度见表 3。

由标准工作曲线配制过程中引入的相对标准不确定度为:

### 2.3.2 标准曲线计算引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(L)$

(1) 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(L_1)$ : 配制的标准曲线经仪器重复测定 2 次, 数据及拟合结果如表 4 所示。

表 2 标准中间液配制过程引入的不确定度

Table 2 Uncertainty resulting from the preparation of midst standard solution

玻璃量器	容量误差			标准不确定度/mL	温度误差		标准不确定度/mL	相对标准不确定度
	体积/mL	允差	计算方式		温度变化/ $^\circ\text{C}$	计算方式		
1 mL 单标线吸量管(A 级)	1.00	$\pm 0.007$	$0.007/\sqrt{3}$	0.004041	$\pm 5$	$\frac{1.2 \times 10^{-3} \times 5 \times 1}{\sqrt{3}}$	0.003466	0.005323
1 mL 分度吸量管(A 级)	0.50	$\pm 0.008$	$0.008/\sqrt{3}$	0.004618	$\pm 5$	$\frac{1.2 \times 10^{-3} \times 5 \times 0.5}{\sqrt{3}}$	0.001732	0.009868
10 mL 容量瓶(A 级)	10.00	$\pm 0.020$	$0.02/\sqrt{3}$	0.011547	$\pm 5$	$\frac{1.2 \times 10^{-3} \times 5 \times 10}{\sqrt{3}}$	0.034641	0.003652

表 3 标准曲线配制引入的不确定度  
Table 3 Uncertainty resulting from preparation of standard curve

玻璃量器	容量误差			温度误差			相对标准不确定度	
	体积/mL	允差	计算方式	标准不确定度/mL	温度变化/℃	计算方式		标准不确定度/mL
1 mL 分度吸量管(A级)	0.10	±0.008	0.008/√3	0.004 618	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 0.10}{\sqrt{3}}$	0.000 202	0.046 224
	0.20	±0.008	0.008/√3	0.004 618	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 0.20}{\sqrt{3}}$	0.000 404	0.023 178
	0.40	±0.008	0.008/√3	0.004 618	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 0.40}{\sqrt{3}}$	0.000 808	0.011 720
	0.60	±0.008	0.008/√3	0.004 618	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 0.60}{\sqrt{3}}$	0.001 212	0.007 957
	0.80	±0.008	0.008/√3	0.004 618	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 0.80}{\sqrt{3}}$	0.001 617	0.006 116
10 mL 容量瓶(A级)	1.00	±0.008	0.008/√3	0.004 618	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 1.00}{\sqrt{3}}$	0.002 021	0.005 041
	10.00	±0.020	0.02/√3	0.011 547	±5	$\frac{7.0 \times 10^{-4} \times 5 \times 10}{\sqrt{3}}$	0.020 201	0.002 327

表 4 标准曲线数据及处理†  
Table 4 Standard curve data and processing

外标质量浓度 $c/(ng \cdot mL^{-1})$	外标与内标 质量浓度比值	外标平均 峰面积	内标平均 峰面积	峰面积比值 $y$
5.0	0.5	284 258	48 467	5.865 0
10.0	1.0	596 546	49 414	12.072 4
20.0	2.0	1 199 131	49 583	24.184 3
30.0	3.0	1 831 865	49 996	36.640 2
40.0	4.0	2 486 158	50 543	49.189 0
50.0	5.0	3 262 294	51 260	63.642 1

† 线性回归方程:  $y=12.710 9c-0.904 3$ , 相关系数  $R^2=0.999 1$ 。

取一阳性样品重复测定 6 次, 根据标准曲线校正含量, 其测定的金刚烷胺平均质量浓度为 25.54 ng/mL, 外标与内标浓度比值  $C_0$  为 2.554, 用拟合直线计算的样品测定浓度引入的标准不确定度按式(2)计算, 相对标准不确定度按式(3)计算。

$$u(L_1) = \frac{S_R}{A_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}}, \quad (2)$$

$$u_{rel}(L_1) = \frac{u(L)}{C_0}, \quad (3)$$

式中:

$A_1$ ——标准工作曲线的斜率,  $A_1=12.710 9$ ;

$A_2$ ——标准工作曲线的截距,  $A_2=-0.904 3$ ;

$p$ ——对  $c_0$  的测定次数, 重复测定 6 次, 即  $p=6$ ;

$n$ ——获得标准工作曲线的每个标准溶液的测定次数, 试验中 6 个浓度各测定 2 次, 即  $n=12$ ;

$S_R$ ——外标与内标峰面积比值残差的标准差,  $S_R =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (A_1 C_i + A_2)]^2}{n - 2}} = 0.473 892;$$

$\bar{c}$ ——获得标准工作曲线中外标与内标浓度比值的平均值,  $\bar{c} = (\sum_{i=1}^n c_i)/6 = 2.583 333$ 。

经计算, 样品测定浓度引入的标准不确定度为 0.018 643, 相对标准不确定度为 0.007 30。

(2) 斜率和截距引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(L_2)$ : 根据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》的相关规定, 标准曲线的斜率  $A_1$  引入的标准不确定度为:

$$u_1(L_2) = \frac{S_R}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}} = 0.121 517, \text{ 其灵敏系数}$$

为:  $c_{A_1} = -(\bar{y} - A_2)/A_1^2 = -0.203 237$ ; 标准曲线的截距  $A_2$  引入的标准不确定度为:  $u_2(L_2) =$

$$S_R \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}} = 0.342 433, \text{ 其灵敏系数为:}$$

$c_{A_2} = -1/A_1 = -0.078 673$ ; 则由标准曲线的斜率和截距引入的标准不确定度和相对标准不确定度分别为:

$$u(L_2) = \sqrt{0.121\ 517^2 \times (-0.203\ 237)^2 + 0.342\ 433^2 \times (-0.078\ 673)^2} = 0.036\ 547;$$

$$u_{rel}(L_2) = \frac{u(L_2)}{c_0} = 0.014\ 31。$$

则标准曲线计算引入的相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(L) = \frac{\sqrt{u_{rel}(L_1)^2 + u_{rel}(L_2)^2}}{\sqrt{0.007\ 30^2 + 0.014\ 31^2}} = 0.016\ 06。$$

### 2.3.3 样品前处理过程引入的不确定度分量 $u_{rel}(P)$

(1) 样品称重引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(P_1)$ ：称取 5 g(精确至 0.001 g)鸡蛋样品，根据 JJG 1036—2008《电子天平检定规程》，最大允许误差为  $\pm 0.005$  g，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则其相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(P_1) = \frac{0.005}{\sqrt{3} \times 5} = 0.000\ 578。$$

(2) 样品前处理提取液定容引入的相对标准不确定度  $u_{rel}(P_2)$  和  $u_{rel}(P_3)$ ：样品提取液最终定容 25 mL，25 mL 容量瓶(A 级)的容量允差为  $\pm 0.03$  mL，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则其相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(P_2) = \frac{0.03}{\sqrt{3} \times 25} = 0.000\ 693。$$

实验室温度变化范围为  $(20 \pm 5)$  °C，提取液为三氯乙酸溶液，定容至 25 mL，考虑选用水的膨胀系数为  $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  进行计算，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则其相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(P_3) = \frac{5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 25}{\sqrt{3} \times 25} = 0.000\ 606。$$

(3) 样品最终定容引入的相对不确定度  $u_{rel}(P_4)$  和

$$u_{rel}(P) = \frac{\sqrt{u_{rel}(P_1)^2 + u_{rel}(P_2)^2 + u_{rel}(P_3)^2 + u_{rel}(P_4)^2 + u_{rel}(P_5)^2 + u_{rel}(P_6)^2 + u_{rel}(P_7)^2}}{\sqrt{0.000\ 578^2 + 0.000\ 693^2 + 0.000\ 606^2 + 0.004\ 041^2 + 0.002\ 021^2 + 0.046\ 188^2 + 0.003\ 464^2}} = 0.046\ 55。$$

### 2.3.4 测量重复性引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(A)$

按照 1.5 项中重复性的试验要求进行 6 次测定，结果分别为 25.7, 25.5, 24.9, 24.8, 25.3, 25.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平均值为 25.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，根据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》规定，采用极差法进行重复性不确定度的评定，按式(4)计算引入的相对标准不确定度。

$$u_{rel}(A) = \frac{R}{C \times \sqrt{n} \times \bar{X}} \quad (4)$$

式中：

R——极差；

C——极差系数；

n——测量次数；

$\bar{X}$ ——测定的平均值。

代入数值求得  $u_{rel}(A) = 0.005\ 76$ 。

### 2.3.5 测定回收率产生的相对标准不确定度 $u_{rel}(R)$

按照 1.5 项的要求进行回收率测定，回收率结果统计见表 5，则回收率引入的相对标准不确定度为：

$u_{rel}(P_5)$ ：样品最终定容至 1 mL，1 mL 单标线吸管(A 级)的容量允差为  $\pm 0.007$  mL，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则其相对标准不确定度分量为：

$$u_{rel}(P_4) = \frac{0.007}{\sqrt{3} \times 1} = 0.004\ 041。$$

最终定容溶剂为甲醇—水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$ )，按照 2.3.2 中计算得甲醇—水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$ )溶液的平均体积膨胀系数，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则温度变化引入的相对标准不确定度分量为：

$$u_{rel}(P_5) = \frac{5 \times 7.0 \times 10^{-4} \times 1}{\sqrt{3} \times 1} = 0.002\ 021。$$

(4) 样品添加内标溶液引入的相对不确定度  $u_{rel}(P_6)$  和  $u_{rel}(P_7)$ ：采用 1 mL 分度吸量管(A 级)移取 0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标工作液 0.10 mL 加入到样品中，按照 1.3 步骤进行处理，1 mL 分度吸量管(A 级)的容量允差为  $\pm 0.008$  mL，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则其相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(P_6) = \frac{0.008}{\sqrt{3} \times 0.10} = 0.046\ 188。$$

内标溶液的溶剂为甲醇，已知 20 °C 甲醇的体积膨胀系数，按照均匀分布  $k = \sqrt{3}$ ，则温度变化引入的相对标准不确定度为：

$$u_{rel}(P_7) = \frac{5 \times 1.2 \times 10^{-3} \times 0.10}{\sqrt{3} \times 0.10} = 0.003\ 464。$$

则样品前处理过程引入的相对标准不确定度为：

$$u(R) = \frac{s(R)}{\sqrt{n}} = \frac{0.028\ 1}{\sqrt{18}} = 0.006\ 623；$$

$$u_{rel}(R) = \frac{u(R)}{\bar{R}} = \frac{0.006\ 623}{0.897} = 0.007\ 38。$$

为了确定回收率是否计入金刚烷胺含量的计算中，根据 CNAS—GL06《化学分析中不确定的评估指南》，对平均回收率  $\bar{R}$  与 1.0 进行显著性检验。

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{u(R)} = \frac{|1 - 0.897|}{0.006\ 623} = 15.552。$$

取置信概率为 95%，经查  $t$  分布表， $t_{(0.05, 17)} = 2.110 < 15.552$ ，说明平均回收率  $\bar{R}$  与 1.0 有显著性差异，因此需要考虑回收率引入的相对标准不确定度。

### 2.4 各个相对标准不确定度分量汇总

超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺含量的各相对标准不确定度来源、类型、数值如表 6 所示。

### 2.5 合成相对标准不确定度

将表 6 中相互独立的各相对标准不确定度分量进行合成，得到相对合成标准不确定度：

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}(S)^2 + u_{rel}(L)^2 + u_{rel}(P)^2 + u_{rel}(A)^2 + u_{rel}(R)^2} = \sqrt{0.08349^2 + 0.01606^2 + 0.04655^2 + 0.00576^2 + 0.00738^2} = 0.09738。$$

表 5 回收率试验结果

Table 5 Results of recovery test

水平/( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	回收率/%					平均回收率/%	总回收率/%	标准差/%
5.0	92.1	93.1	88.4	87.4	88.6	86.2	89.3	
10.0	88.3	86.6	92.0	89.4	90.0	91.3	89.6	2.81
20.0	94.2	91.7	93.0	86.6	88.2	87.7	90.2	

表 6 相对标准不确定度计算结果

Table 6 Results of relative standard uncertainty

不确定度来源	不确定度类型	值
标准溶液配制与稀释 $u_{rel}(S)$	B	0.08349
标准曲线拟合 $u_{rel}(L)$	A	0.01606
样品前处理过程 $u_{rel}(P)$	B	0.04655
测量重复性 $u_{rel}(A)$	A	0.00576
测定回收率 $u_{rel}(R)$	A	0.00738

2.6 扩展不确定度

依据 JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》，取包含因子  $k=2$ (置信水平 95%)，试样中金刚烷胺含量的平均值为 25.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，则扩展不确定度为：

$$U(X) = u_{rel}(X) \times \bar{X} \times 2 = 0.09738 \times 25.2 \times 2 = 4.9 \mu\text{g}/\text{kg}。$$

3 测量结果及其不确定度报告

用同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺含量，当称样量为 5 g 时， $k=2$ (置信度为 95%)，测定结果为 (25.2±4.9)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

4 结论

采用同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺含量，通过对试验过程中引入的各不确定度分量进行综合考量，结果表明，标准溶液配制和样品前处理过程引入的不确定度较大，而测量回收率、重复性以及标准曲线拟合为贡献较小的不确定度分量。其中，标准溶液配制中又以标准工作曲线制备引入的不确定度最大，样品前处理过程中以样品添加内标溶液引入的不确定度较大。因此，在实际的试验过程中，要加强标准溶液配制的规范性和一致性，移取标准溶液要选用合适的器具，提升试验人员的操作水平，减少人为因素的影响，从而保证检测结果的准确性。

参考文献

[1] 庾金良, 张晓燕, 卜洪忠. 高效液相色谱—串联质谱法测定鸡肉产品中金刚烷胺残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2015, 51

(2): 224-227.

[2] 林胜军, 黄诚. 全自动固相萃取—超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡肉中的金刚烷胺和利巴韦林[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(1): 149-154.

[3] 云环, 崔凤云, 严华, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡肉中的利巴韦林和金刚烷胺[J]. 色谱, 2013, 31(8): 724-728.

[4] FARAJZADEH M A, NINA N, ALIZADEH-NABIL A A. Determination of amantadine in biological fluids using simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection[J]. Journal of Chromatography B, 2013, 940: 142-149.

[5] 楼永军, 陈爽, 陶巧凤. 毛细管柱气相色谱法测定盐酸金刚烷胺有关物质[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 493-495.

[6] CUI Shuang-jin, FENG Fang, LIU Han, et al. New method for high performance liquid chromatographic determination of amantadine and its analogues in rat plasma[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007, 44(5): 1100-1105.

[7] 李娜, 高毓涛. HPLC-RID 法同时测定小儿氨酚烷胺颗粒中对乙酰氨基酚及盐酸金刚烷胺的含量[J]. 今日药学, 2017, 27(9): 609-611.

[8] 邵琳智, 姚仰勋, 谢敏玲, 等. 亲水相互作用色谱—串联质谱法同时测定动物组织中金刚烷胺与利巴韦林[J]. 分析测试学报, 2013, 32(12): 1448-1452.

[9] 吴银良, 赵健, 叶宇飞, 等. 同位素稀释液相色谱—串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2014, 33(8): 905-910.

[10] 陈燕, 邵晓赞, 刘畅. 液相色谱—串联质谱法检测动物源性食品中 7 种抗病毒类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 798-808.

[11] 国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2012: 1-53.

[12] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL006: 2019[S]. 北京: 中国质检出版社, 2019: 1-138.