

液相色谱—串联质谱法测定蜂蜜中 4 种喹诺酮类药物残留量的不确定度评定

Uncertainty evaluation for the determination of four quinolone residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

杨 韵^{1,2} 曹 阳^{1,2} 李 菁^{1,2} 钟菲菲^{1,2} 左 贺³

YANG Yun^{1,2} CAO Yang^{1,2} LI Jing^{1,2} ZHONG Feifei^{1,2} ZUO He³

(1. 长沙市食品药品检验所, 湖南 长沙 410036; 2. 湖南酒类产品质量检验检测中心〔湖南〕, 湖南 长沙 410036; 3. 湖南劳动人事职业学院, 湖南 长沙 410100)

(1. Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha, Hunan 410036, China; 2. National Alcohol Products Quality Inspection and Testing Center [Hunan], Changsha, Hunan 410036, China; 3. Hunan Labor and Human Resources Vocational College, Changsha, Hunan 410100, China)

摘要:目的: 对液相色谱—串联质谱法测定蜂蜜中 4 种喹诺酮类药物残留量进行不确定度评定。方法: 根据 GB 31657.2—2021 规定的方法建立数学模型, 分析不确定度来源, 并评定各标准不确定度的分量。结果: 蜂蜜中恩诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、环丙沙星残留量测量结果不确定度分别为 (4.97 ± 0.81) , (10.13 ± 1.58) , (7.67 ± 1.23) , (14.97 ± 2.25) $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P = 95\%$, $k = 2$)。结论: 试验测量不确定度的主要来源为标准溶液配制与稀释过程和标准曲线拟合, 在实际工作中应加以控制。

关键词: 不确定度; 液相色谱—串联质谱法; 恩诺沙星; 沙拉沙星; 氧氟沙星; 环丙沙星; 蜂蜜

Abstract: Objective: This study aimed to evaluate the determination uncertainty of four quinolones residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Methods: Based on GB 31657.2—2021, a mathematical model for sources of uncertainty evaluation was established. The uncertainty of each variable which affect the result were calculated and the weight of each uncertainty component was assessed. **Results:** The uncertainties in the determination of enrofloxacin, sarafloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin in honey were (4.97 ± 0.81) , (10.13 ± 1.58) , (7.67 ± 1.23) , (14.97 ± 2.25) $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P = 95\%$, $k = 2$) respectively. **Conclusion:** The

main influencing factors of the determination uncertainty were preparation and dilution process of standard solution and fitting of standard curve, which should be controlled in practical work.

Keywords: uncertainty; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); enrofloxacin; sarafloxacin; ofloxacin; ciprofloxacin; honey

中国有着悠久的养蜂史, 是全球蜂蜜生产、贸易大国, 产量和出口量均居世界首位^[1]。随着现代畜牧业向规模化、集约化发展, 蜂蜜中检出兽药的情况时有发生。2002 年欧盟以抗生素(氯霉素)残留超标为由, 全面禁止中国蜂蜜进入欧盟市场, 因此, 抗生素残留控制已成为食品安全工作中的重要一环, 其检测技术也是食品安全研究领域亟待解决的课题^[2-3]。

喹诺酮类药物是一种人工合成的含 4-喹诺酮基本结构的类抗菌药物, 主要是将拓扑异构酶与细菌 DNA 螺旋酶作为靶点, 抑制 DNA 回旋酶促进 DNA 复制, 对细菌 DNA 造成不可逆损伤以发挥抗菌效果, 对多种革兰氏阴性菌的杀菌效果明显^[4-6]。喹诺酮类药物具有抗菌活性强、抗菌谱广泛、不良反应少、体内分布良好等多重优势, 被广泛应用于人和动物的疾病治疗^[7]。腐臭病、败血病等细菌性疾病会严重影响蜜蜂产蜜的产量和质量, 为了蜜蜂的健康, 蜂农会使用喹诺酮类药物为蜜蜂“治病”, 若产生抗药性, 则会加大用药剂量, 从而造成蜂蜜的药物残留^[8]。研究^[9]表明, 长期食用含喹诺酮类药物残留的蜂蜜会导致人体中枢神经系统出现问题, 严重者甚至出现肌无力的状况, 并且还有一定的致癌性。

基金项目: 湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号: 2023KJJH29)

作者简介: 杨韵, 女, 长沙市食品药品检验所工程师, 硕士。

通信作者: 钟菲菲(1983—), 女, 长沙市食品药品检验所高级工程师, 硕士。E-mail: Zhongfeifei83@163.com

收稿日期: 2023-12-27 **改回日期:** 2024-02-26

不确定度是以测量结果本身为研究对象,由于随机影响和系统影响的存在而对测量结果不能肯定的程度,只要是测量数据,都不可避免地存在不确定度,是客观存在的影响检测结果准确的因素^[10-12]。为保证检测结果的准确性,可以通过不确定度的评定来判定试验结果的质量,因此不确定度也是测量结果的一部分,同时是评价测量活动质量的重要指标,是衡量检测结果准确性和可靠性的重要参数^[13-14]。研究拟依据 GB 31657.2—2021 对蜂蜜进行检测,并参照现行有效的相关标准及指南对蜂蜜中喹诺酮类药物残留的检测结果进行不确定度评定^[15-17],分析检测过程中各测量不确定度分量对结果的影响,找出需要重点关注的环节,为实验室内部质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂蜜:抽检样品;
水:GB/T 6682 规定的一级水;
甲醇、乙腈:色谱纯,德国 MERCK 公司;
甲酸:色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;
恩诺沙星(CAS No.: 93106-60-6)、盐酸沙拉沙星(CAS No.:91296-87-6)、氧氟沙星(CAS No.:82419-36-1)、环丙沙星(CAS No.:85721-33-1):北京曼哈格生物科技有限公司;
其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

液相色谱串联三重四极杆质谱仪:Triple Quad 5500+ 型,美国 AB SCIEX 公司;
固相萃取柱:Oasis PRiME HLB 型,200 mg/6 mL,美国 Waters 公司;
分析天平:X5205DU 型,德国 Mettler toledo 公司;
高速冷冻离心机:X1R 型,赛默飞世尔科技有限公司;
氮吹仪:N-EVAP45 型,美国 Organomation 公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的制备 分别精密称取恩诺沙星 0.010 08 g、盐酸沙拉沙星 0.011 26 g、氧氟沙星 0.010 13 g、环丙沙星 0.010 35 g,用 0.5 mL 氨水溶解,并用甲醇定容至 10 mL 容量瓶,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液;用移液管准确量取 0.1 mL 各标准储备液于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准中间液;分别准确吸取 0.10, 0.20,0.50,1.00,2.00,5.00 mL 混合标准中间液于 100 mL 容量瓶中,用 20%乙腈—甲酸水溶液(20 mL 乙腈中加入 80 mL 0.1%甲酸溶液)定容,配制成质量浓度分别为 1, 2,5,10,20,50 ng/mL 的标准系列工作液,各取 1.00 mL,

分别加入经提取、净化处理的空白试料中,溶解残余物,上清液过微孔尼龙滤膜后,上机测定。

1.3.2 样品前处理

(1) 提取:称取 2.024 3 g 蜂蜜样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入磷酸盐缓冲液 20 mL,涡旋 1 min,振荡 10 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。
(2) 净化:固相萃取柱分别用 10 mL 甲醇、10 mL 水活化,将备用上清液过柱,用 5 mL 水淋洗,抽干后依次用 4 mL 5%的甲酸—甲醇和 4 mL 乙酸乙酯洗脱,抽干后收集洗脱液,40 ℃氮气吹干。用 1.00 mL 20%乙腈—甲酸水溶液溶解残余物,超声 1 min 后涡旋混匀,上清液过尼龙滤膜,待测。

1.3.3 液相色谱条件 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈, 2.1 mm×100 mm,1.8 μm;柱温 35 ℃;进样量 10 μL;流速 0.3 mL/min;流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇;按表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序		
Table 1 Gradient eluted program		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95	5
1.5	80	20
4.5	60	40
6.5	5	95
7.5	5	95
7.6	95	5
10.0	95	5

1.3.4 质谱条件 电喷雾离子源;正离子扫描;多反应监测(MRM);电喷雾电压(IS)5 000 V;离子源温度(TEM) 500 ℃;雾化气压力(GS1)379 kPa;雾化气压力(GS2) 379 kPa;气帘气压力(CUR)207 kPa;碰撞器(CDA) 62 kPa,质谱参数设置见表 2。

1.3.5 数学模型建立 按式(1)建立数学模型。

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m}, \tag{1}$$

式中:
X——样品中相应的喹诺酮类药物残留量,μg/kg;
C_s——基质标准溶液中相应的喹诺酮类药物质量浓度,ng/mL;
A_s——基质标准溶液中相应的喹诺酮类药物峰面积;
A——样品溶液中相应的喹诺酮类药物峰面积;
V——溶解残余物溶液体积,mL;
m——样品质量,g。

表 2 多反应监测模式下 6 种化合物的质谱分析参数

Table 2 MS parameters of 6 kinds of target compounds for MRM mode

化合物	保留时间/min	CAS 号	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能/eV
沙拉沙星	3.45	98105-99-8	386.09>299.02	386.09>299.02	28	24
			386.09>342.06			16
氧氟沙星	2.73	82419-36-1	362.11>261.07	362.11>261.07	4	24
			362.11>318.08			18
恩诺沙星	3.00	93106-60-6	360.13>316.10	360.13>316.10	38	16
			360.13>245.06			24
环丙沙星	2.97	85721-33-1	332.10>231.01	332.10>231.01	2	30
			332.10>288.08			16

1.3.6 不确定度分量的主要来源分析 根据试验步骤和数学模型进行分析,影响样品中喹诺酮类药物残留量的测量不确定度主要有:标准溶液配制与稀释过程引入的不确定度;标准曲线拟合引入的不确定度;样品称样量引入的不确定度;样品定容体积引入的不确定度;测量重复性引入的不确定度;加标回收引入的不确定度。

2 结果与分析

2.1 标准溶液配制与稀释过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(C)$

2.1.1 标准物质纯度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_p)$

4 种标准物质的标准不确定度均为 $\pm 2.0\%$,取包含因子 $k=2$,标准不确定度 $u(C_p)=\frac{2\%}{2}=1\%$,由恩诺沙星标准物质(纯度为 99.4%)引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{p\text{恩}})=\frac{1\%}{99.4\%}=0.010\ 06$;同理,沙拉沙星标准物质(纯度为 $97.7\%[89.3\%]$)的 $u_{\text{rel}}(C_{p\text{沙}})=\frac{1\%}{89.3\%}=0.011\ 20$,氧氟沙星标准物质(纯度为 99.0%)的 $u_{\text{rel}}(C_{p\text{氧}})=\frac{1\%}{99.0\%}=0.010\ 10$,环丙沙星标准物质(纯度为 98.4%)的 $u_{\text{rel}}(C_{p\text{环}})=\frac{1\%}{98.4\%}=0.010\ 16$ 。

2.1.2 标准物质称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_w)$

使用十万分之一天平精确称量标准品 $0.010\ 00\ \text{g}$,按照天平检定证书和 JJG 1036—2022,该称量范围最大允差为 $\pm 0.000\ 05\ \text{g}$,取均匀分布 $k=\sqrt{3}$,则 $u(C_w)=\frac{0.000\ 05}{\sqrt{3}}=0.000\ 029\ \text{g}$ 。称取恩诺沙星 $0.010\ 08\ \text{g}$,则 $u_{\text{rel}}(C_{w\text{恩}})=\frac{0.000\ 029}{0.010\ 08}=0.002\ 88$;称取盐酸沙拉沙星 $0.011\ 26\ \text{g}$,则 $u_{\text{rel}}(C_{w\text{沙}})=\frac{0.000\ 029}{0.011\ 26}=0.002\ 58$;称取氧

氟沙星 $0.010\ 13\ \text{g}$,则 $u_{\text{rel}}(C_{w\text{氧}})=\frac{0.000\ 029}{0.010\ 13}=0.002\ 86$;

称取环丙沙星 $0.010\ 35\ \text{g}$,则 $u_{\text{rel}}(C_{w\text{环}})=\frac{0.000\ 029}{0.010\ 35}=0.002\ 80$ 。

2.1.3 标准储备液制备过程引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_m)$

配制质量浓度为 $1\ \text{mg/mL}$ 的标准储备液需要用到 1 个 $10\ \text{mL}$ 的 A 级单标线容量瓶,根据 JJG 196—2006 的规定,在标准温度 $20\ ^\circ\text{C}$ 时 $10\ \text{mL}$ A 级单标线容量瓶容量允差为 $\pm 0.020\ \text{mL}$,取均匀分布,则定容引入的标准不确定度 $u(C_{m\text{v}})=\frac{0.020}{\sqrt{3}}=0.011\ 55\ \text{mL}$ 。4 种喹诺酮标准储备液用甲醇定容, $20\ ^\circ\text{C}$ 时甲醇的体积膨胀系数为 $0.001\ 19\ ^\circ\text{C}^{-1}$,在 $(25\pm 5)\ ^\circ\text{C}$ 实验室环境条件下操作,取均匀分布,则温度引入的标准不确定度 $u(C_{m\text{t}})=\frac{10\times 0.001\ 19\times 5}{\sqrt{3}}=0.034\ 35\ \text{mL}$ 。因此,标准储备液制备过程引入的相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(C_m)=\frac{\sqrt{0.011\ 55^2+0.034\ 35^2}}{10}=0.003\ 62$ 。

2.1.4 混合标准中间液制备过程引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_s)$

配制质量浓度为 $1\ \mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液需要用到 1 支 $1\ \text{mL}$ A 级分度吸量管,1 个 $100\ \text{mL}$ A 级单标线容量瓶。取均匀分布,量具及温度波动引入的不确定度见表 3。

因此,由混合标准中间液制备过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C_s)=\sqrt{0.046\ 32^2+0.003\ 48^2}=0.046\ 45。$$

2.1.5 标准系列工作液制备过程引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_g)$

配制标准系列工作液需要用到 4 支 $1\ \text{mL}$ A 级分度吸量管,1 支 $2\ \text{mL}$ A 级单标线吸量管,1 支 $5\ \text{mL}$ A 级单标线吸量管,6 个 $100\ \text{mL}$ A 级单标线容量

瓶。100 mL A 级容量瓶最大容量允差为±0.10 mL,取均匀分布,则 $u(C_{\text{gvl}})=\frac{0.10}{\sqrt{3}}=0.057\ 74\ \text{mL}$;用 20% 乙腈—甲酸水溶液定容,以 20 ℃ 下水的体积膨胀系数 $0.000\ 21\ \text{℃}^{-1}$ 来计算,在 $(25\pm 5)\ \text{℃}$ 实验室环境条件下操作, $u(C_{\text{gt1}})=\frac{100\times 0.000\ 21\times 5}{\sqrt{3}}=0.060\ 62\ \text{mL}$ 。则容量瓶引入相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{g容}})=\frac{\sqrt{u(C_{\text{gvl}})^2+u(C_{\text{gt1}})^2}}{100}=0.000\ 84$ 。吸量管吸取不同体积溶液所引起的相对不确定度见表 4,其中,

$$u(C_{\text{gt2}})=\frac{0.000\ 21V\times 5}{\sqrt{3}}。$$

综上,标准系列工作液制备过程引入的相对标准不确定度为:

表 4 吸量管引入的不确定度
Table 4 Uncertainty from pipette

标准溶液质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	吸量体积/ mL	吸量管规格/ mL	容量允差/ mL	$u(C_{\text{gv2}})/$ mL	$u(C_{\text{gt2}})/$ mL	$u_{\text{rel}}(C_{\text{g吸i}})$
1	0.10	1.00	±0.008	0.004 62	0.000 06	0.046 19
2	0.20	1.00	±0.008	0.004 62	0.000 12	0.023 10
5	0.50	1.00	±0.008	0.004 62	0.000 30	0.009 26
10	1.00	1.00	±0.008	0.004 62	0.000 61	0.004 66
20	2.00	2.00	±0.010	0.005 77	0.001 21	0.002 95
50	5.00	5.00	±0.015	0.008 66	0.003 03	0.001 84

$$u_{\text{rel}}(C)=\sqrt{6u_{\text{rel}}(C_{\text{g容}})^2+\sum_{i=1}^6u_{\text{rel}}(C_{\text{g吸i}})^2}=\sqrt{6\times 0.000\ 84^2+0.046\ 19^2+0.023\ 10^2+0.009\ 26^2+0.004\ 66^2+0.002\ 95^2+0.001\ 84^2}=0.052\ 83。$$

标准溶液配制与稀释过程引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(C)=\sqrt{u_{\text{rel}}(C_{\text{p}})^2+u_{\text{rel}}(C_{\text{w}})^2+u_{\text{rel}}(C_{\text{m}})^2+u_{\text{rel}}(C_{\text{s}})^2+u_{\text{rel}}(C_{\text{g}})^2}。$$

计算得: $u_{\text{rel}}(C_{\text{恩}})=0.071\ 21$; $u_{\text{rel}}(C_{\text{沙}})=0.071\ 37$;
 $u_{\text{rel}}(C_{\text{氧}})=0.071\ 22$; $u_{\text{rel}}(C_{\text{环}})=0.071\ 22$ 。

2.2 标准曲线拟合引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(F)$

标准系列工作液 6 个浓度,每个浓度测定 3 次,用最小二乘法拟合标准系列工作液各质量浓度与峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得到的线性回归方程见表 5。被测样品重复测定 6 次,分别从标准曲线上拟合得到喹诺酮类药物残留量见表 6。

按式(3)、式(4)计算标准曲线拟合引入的相对标准不确定度。

表 3 混合标准中间液制备过程引入的不确定度

Table 3 Uncertainty from the preparation procedure of mix standard intermediate solution

来源	项目	1 mL 分度 吸量管	100 mL 单标线 容量瓶
容量	容量允差/mL	±0.008	±0.10
误差	计算方式	$0.008/\sqrt{3}$	$0.10/\sqrt{3}$
	不确定度/mL	0.004 62	0.057 74
温度	甲醇体积膨胀 系数/℃ ⁻¹	0.001 19	0.001 19
	计算方式	$\frac{0.1\times 0.001\ 19\times 5}{\sqrt{3}}$	$\frac{100\times 0.001\ 19\times 5}{\sqrt{3}}$
	不确定度/mL	0.000 34	0.343 52
	合成不确定度	0.004 63	0.348 34
	相对合成不确定度	0.046 32	0.003 48

$$u_{\text{rel}}(F)=\frac{S}{c_0\times a}\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{mn}+\frac{(c_0-\bar{C})^2}{\sum_{i=1}^{mn}(c_0-\bar{C})^2}},$$

$$S=\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{mn}(A_j-ac_j-b)^2}{mn-2}},$$

式中:

$u_{\text{rel}}(F)$ ——标准曲线拟合引入的相对标准不确定度;

S ——标准溶液峰面积比残差的标准差;

c_0 ——由标准曲线拟合得到的样品中喹诺酮类药物残留量的平均质量浓度,ng/mL;

a ——线性回归方程的斜率;

P ——样品重复测定次数, $P=6$;

m ——标准曲线的浓度个数, $m=6$;

n ——标准曲线每个浓度溶液测定次数, $n=3$;

表 5 标准曲线
Table 5 Standard curve

待测物	质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	峰面积			线性回归方程	相关系数
		1	2	3		
恩诺沙星	1	19 990	19 640	19 880	$A_{\text{恩}}=50\,442.92c-52\,147.23$	0.998 8
	2	27 160	27 780	29 430		
	5	182 600	186 500	192 700		
	10	485 000	503 800	507 200		
	20	922 500	933 500	879 600		
	50	2 428 000	2 501 000	2 512 000		
沙拉沙星	1	21 000	21 130	21 440	$A_{\text{沙}}=25\,523.63c-6\,369.41$	0.998 9
	2	30 250	32 540	32 830		
	5	101 800	103 300	106 600		
	10	266 100	269 300	276 500		
	20	514 000	518 900	521 900		
	50	1 251 000	1 256 000	1 279 000		
氧氟沙星	1	45 770	46 210	46 600	$A_{\text{氧}}=103\,695.51c-150\,485.26$	0.998 2
	2	80 960	84 590	89 450		
	5	320 000	330 700	346 800		
	10	876 900	887 800	892 100		
	20	1 712 000	1 761 000	1 870 000		
	50	4 923 000	5 045 000	5 308 000		
环丙沙星	1	41 110	42 990	43 860	$A_{\text{环}}=131\,053.84c+24\,708.10$	0.998 5
	2	263 400	278 300	278 500		
	5	650 700	708 500	719 600		
	10	1 499 000	1 501 000	1 526 000		
	20	2 585 000	2 604 000	2 615 000		
	50	6 494 000	6 570 000	6 622 000		

$\bar{C}$ ——标准曲线的平均配制质量浓度, $\bar{C} = \frac{\sum_{j=1}^m c_j}{6} = 14.67 \text{ ng/mL}$;
 c_i ——第 i 个由标准曲线拟合的标准溶液质量浓度, ng/mL;
 A_j ——第 j 个标准溶液的峰面积;
 c_j ——第 j 个标准溶液的配制质量浓度, ng/mL;
 b ——线性回归方程的截距。

将各值代入式(4)得: $S_{\text{恩}} = 37\,163.680\,38$, $S_{\text{沙}} = 16\,132.613\,53$, $S_{\text{氧}} = 110\,103.370\,46$, $S_{\text{环}} = 96\,300.170\,38$;
 $u_{\text{rel}}(F_{\text{恩}}) = 0.034\,86$, $u_{\text{rel}}(F_{\text{沙}}) = 0.014\,74$, $u_{\text{rel}}(F_{\text{氧}}) = 0.032\,26$, $u_{\text{rel}}(F_{\text{环}}) = 0.012\,58$ 。

2.3 样品称量量引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(M)$

使用电子天平称量样品 2.024 3 g, 根据检定证书知该称量范围最大允差为 $\pm 0.000\,5 \text{ g}$, 取均匀分布, 则
 $u(m) = \frac{0.000\,5}{\sqrt{3}} = 0.000\,29 \text{ g}$, 样品称量量引入的相对标

准不确定度 $u_{\text{rel}}(m) = \frac{n(M)}{2.024\,3} = \frac{0.000\,29}{2.024\,3} = 0.000\,14$ 。

2.4 样品定容体积引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$

根据 JJG 196—2006, 在标准温度 20 ℃ 时 1 mL A 级分度吸量管最大允差为 $\pm 0.008 \text{ mL}$, 取均匀分布, 标准不确定度 $u(V) = \frac{0.008}{\sqrt{3}} = 0.004\,62 \text{ mL}$, 则样品定容体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V) = \frac{u(V)}{1} = 0.004\,62$ 。

2.5 测量重复性引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$

在空白蜂蜜样品中分别添加质量浓度为 5, 10, 8, 15 $\mu\text{g/kg}$ 的恩诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星和环丙沙星, 从样品称量开始重复测定 6 次 ($n=6$), 测量结果见表 6。用贝塞尔公式(5)~式(7)计算测量重复性引入的相对标准不确定度。

$$S(R) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}, \tag{5}$$

表 6 样品重复测定数据

Table 6 Repeated determination results of sample			
待测物	平均质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	平均含量 $\bar{X}$ / (μg · kg ⁻¹)	S(R) / (μg · kg ⁻¹)
恩诺沙星	10.052 9	4.97	0.168 4
沙拉沙星	20.507 9	10.13	0.643 6
氧氟沙星	15.519 0	7.67	0.330 8
环丙沙星	30.301 5	14.97	0.756 8

$$u(R) = \frac{S(R)}{\sqrt{n}}, \tag{6}$$

$$u_{\text{rel}}(R) = \frac{u(R)}{\bar{X}}. \tag{7}$$

计算得： $u_{\text{rel}}(R_{\text{恩}}) = 0.012\ 38$ ， $u_{\text{rel}}(R_{\text{沙}}) = 0.023\ 12$ ， $u_{\text{rel}}(R_{\text{氧}}) = 0.015\ 76$ ， $u_{\text{rel}}(R_{\text{环}}) = 0.018\ 39$ 。

2.6 加标回收引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(A)$

取 6 份空白样品，在恩诺沙星 5 μg/kg、沙拉沙星 10 μg/kg、氧氟沙星 8 μg/kg、环丙沙星 15 μg/kg 质量浓

$$u_{\text{rel恩}} = \sqrt{u_{\text{rel}}(C_{\text{恩}})^2 + u_{\text{rel}}(F_{\text{恩}})^2 + u_{\text{rel}}(M_{\text{恩}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{恩}})^2 + u_{\text{rel}}(R_{\text{恩}})^2 + u_{\text{rel}}(A_{\text{恩}})^2} = \sqrt{0.071\ 21^2 + 0.034\ 86^2 + 0.000\ 14^2 + 0.004\ 62^2 + 0.012\ 38^2 + 0.010\ 18^2} = 0.081\ 02;$$

$$u_{\text{rel沙}} = 0.078\ 09; u_{\text{rel氧}} = 0.080\ 50; u_{\text{rel环}} = 0.075\ 05。$$

根据 RB/T 030—2020，以恩诺沙星为例，当恩诺沙星含量为 4.97 μg/kg 时，其合成标准不确定度 $u_{\text{恩}} = 4.97 \times 0.081\ 02 = 0.403\ \mu\text{g/kg}$ ，扩展不确定度 $U_{\text{恩}} = u_{\text{恩}} \times k = 0.403 \times 2 = 0.81\ \mu\text{g/kg}$ 。则 $u_{\text{沙}} = 0.791\ \mu\text{g/kg}$ ， $U_{\text{沙}} = 1.58\ \mu\text{g/kg}$ ； $u_{\text{氧}} = 0.617\ \mu\text{g/kg}$ ， $U_{\text{氧}} = 1.23\ \mu\text{g/kg}$ ； $u_{\text{环}} = 1.123\ \mu\text{g/kg}$ ， $U_{\text{环}} = 2.25\ \mu\text{g/kg}$ （取包含因子 $k = 2$ ，置信水平 $P = 95\%$ ）。

4 测量结果及其不确定度报告

采用液相色谱—串联质谱法测定蜂蜜中喹诺酮类药物残留量，恩诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、环丙沙星的测量不确定度结果分别表示为： $X_{\text{恩}} = (4.97 \pm 0.81)\ \mu\text{g/kg}$ ； $X_{\text{沙}} = (10.13 \pm 1.58)\ \mu\text{g/kg}$ ； $X_{\text{氧}} = (7.67 \pm 1.23)\ \mu\text{g/kg}$ ； $X_{\text{环}} = (14.97 \pm 2.25)\ \mu\text{g/kg}$ 。

5 结论

研究采用液相色谱—串联质谱法对蜂蜜中喹诺酮类药物残留量进行了测定，通过建立数学模型对试验过程中引入的不确定度各分量进行了评定。结果表明，标准溶液配制与稀释过程、标准曲线拟合对试验的不确定度结果贡献最大且不容忽视，其次是样品重复性测定和加标回收。因此，在测定蜂蜜中喹诺酮类药物残留量的实际工作中，要确保标准溶液配制及稀释精准，选择精密度高的移液器和容量瓶，增加标准溶液、样品的测量次数，多做平行测定，提高检验操作技术，定期维护保养测量仪

度下进行加标回收，样品回收率见表 7。

表 7 样品回收率

Table 7 The recovery ratio of sample				
试验数	恩诺沙星/%	沙拉沙星/%	氧氟沙星/%	环丙沙星/%
1	86.74	92.46	88.07	90.58
2	85.39	87.35	89.94	91.34
3	85.01	91.52	90.76	92.45
4	90.57	83.43	86.13	92.96
5	88.36	90.70	91.64	93.27
6	89.05	88.89	87.20	89.50
S(A)	2.181 5	3.315 1	2.157 8	1.472 2
u(A)	0.890 6	1.353 4	0.880 9	0.601 0

计算得： $u_{\text{rel}}(A_{\text{恩}}) = 0.010\ 18$ ， $u_{\text{rel}}(A_{\text{沙}}) = 0.015\ 20$ ， $u_{\text{rel}}(A_{\text{氧}}) = 0.009\ 90$ ， $u_{\text{rel}}(A_{\text{环}}) = 0.006\ 56$ 。

3 合成标准不确定度与扩展不确定度

根据各不确定度分量得，相对合成标准不确定度为：

器，从而降低操作过程中各不确定度分量对检测结果的影响，提高检测结果的准确度。

方法 GB 31657.2—2021 包含了 14 种喹诺酮药物，试验只选取了其中 4 种较常见、易检出、具有一定代表性的药物，其中，2021 年国家食品安全监督抽查计划将氧氟沙星列为蜂产品的风险监测项目。但该研究未考虑方法中其余 10 种药物的不确定度，加标浓度相对随机，且未考虑检测仪器对试验结果带来的影响，对实际工作的指导仍然存在一定的局限性。因此，在日常检测工作中应该以检出结果为目标，综合全面考虑不确定度来源，才能使检测结果更加准确、科学、规范。

参考文献

[1] 张明霞. 入世以来中国蜂蜜贸易形势分析[J]. 蜜蜂杂志, 2021, 41(5): 12-16.
ZHANG M X. Analysis of China's honey trade since China's entry into WTO[J]. Journal of Bee, 2021, 41(5): 12-16.
[2] 李周敏, 邵诚, 方惠群. 蜂蜜中残留抗生素的检测方法研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(5): 568-570.
LI Z M, SHAO C, FANG H Q. Detection methods of antibiotics residues in honey: A review[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2012, 16(5): 568-570.
[3] 唐林林. 蜂群用药对蜂蜜中药物残留影响的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008: 1-19.
TANG L L. Effects of drug use in honeybee colony on drug residues in honey [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry

- University, 2008: 1-19.
- [4] 王伟. 喹诺酮类药物的耐药、联合用药及不良反应的探讨[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(61): 12037.
- WANG Y. Analysis of drug resistance, drug combination and adverse reactions of quinolones[J]. Electronic Journal of Clinical Medical Literature, 2017, 4(61): 12037.
- [5] 范维, 高晓月, 陈超, 等. 动物源性食品中喹诺酮类药物残留的检测[J]. 肉类研究, 2017, 31(4): 36-42.
- FAN W, GAO X Y, CHEN C, et al. Screening and confirmation of quinolones residues in animal-derived food[J]. Meat Research, 2017, 31(4): 36-42.
- [6] 朱盈蕊. 动物性食品中喹诺酮类药物残留的快速检测方法研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012: 3-5.
- ZHU Y R. Research on rapid detection method of quinolone drugs residue analysis in animal foodstuff [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012: 3-5.
- [7] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330.
- WANG F, ZHU D M, HU F P, et al. 2012 CHINET surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 13(5): 321-330.
- [8] 徐书法, 曹坦, 辛广, 等. 蜂产品中抗生素残留检测技术研究概况[J]. 现代科学仪器, 2009(4): 134-140.
- XU S F, CAO T, XIN G, et al. Research situation on detection of antibiotic residues in bee products [J]. Modern Scientific Instruments, 2009(4): 134-140.
- [9] 周艳华, 李涛, 潘小红, 等. 液液萃取-超高效液相色谱-串联质谱法快速检测原料乳中18种喹诺酮类药物残留[J]. 食品与机械, 2021, 37(8): 63-69, 76.
- ZHOU Y H, LI T, PAN X H, et al. Simultaneous rapid determination of 18 quinolones residues in raw milk by liquid-liquid extraction and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2021, 37(8): 63-69, 76.
- [10] 袁圆, 曾辉, 肖艳, 等. 高效液相色谱法测定橙汁中酸性大红 GR 的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2022, 38(6): 88-92, 167.
- YUAN Y, ZENG H, XIAO Y, et al. Evaluation of uncertainty in the determination of acid scarlet GR in orange juice by high performance liquid chromatography[J]. Food & Machinery, 2022, 38(6): 88-92, 167.
- [11] 国家市场监督管理总局. 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.
- State Administration for Market Regulation. Evaluation and expression of uncertainty in measurement: JJF 1059.1—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012: 1-53.
- [12] 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.
- WANG J Q. HPLC-MS/MS uncertainty evaluation for determination of quinolones residues in aquatic products [J]. Guangdong Chemical Industry, 2018, 45(12): 227-229.
- [13] YANG M R, LIU F, WANG M, et al. Development of a whole liquid egg certified reference material for accurate measurement of enrofloxacin residue[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125253.
- [14] 施元旭, 张水锋, 潘项捷, 等. 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[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 37-42.
- SHI Y X, ZHANG S F, PAN X J, 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 & Machinery, 2020, 36(10): 37-42.
- [15] 丁京鞍, 赵继男, 贾琨, 等. 《电子天平检定规程》解读: JJG 1036—2022[J]. 中国计量, 2023(9): 61-63, 68.
- DING J A, ZHAO J N, JIA K, et al. Electronic Balance interpret: JJG 1036—2022[J]. China Metrology, 2023(9): 61-63, 68.
- [16] 国家市场监督管理总局. 常用玻璃量器: JJG 196—2006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006: 1-18.
- State Administration for Market Regulation. Working glass container: JJG 196—2006[S]. Beijing: China Metrology Press: 2006: 1-18.
- [17] 国家认证认可监督管理委员会. 化学分析中测量不确定度评估指南: RB/T 030—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020: 1-96.
- National Certification and Accreditation Administration. Guidance of quantifying measurement uncertainty in chemical analysis: RB/T 030—2020[S]. Beijing: Standards Press China, 2020: 1-96.
- (上接第74页)
- [23] XU L L, WU R M, GENG X, et al. Rapid detection of sulfonamide antibiotics residues in swine urine by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2022, 267: 120570.
- [24] ZHANG Y S, WANG Y, LIU A R, et al. Fabrication of flexible SERS substrate based on Au nanostars and PDMS for sensitive detection of thiram residue in apple juice[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2023, 297: 122721.
- [25] BALAN C, POP L C, BAI A M. IR, Raman and SERS analysis of amikacin combined with DFT-based calculations[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2019, 214: 79-85.
- [26] JIN Y, JAN J W, HAN C H, et al. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(20): 7 639-7 643.
- [27] DAI P, ZHANG Y, HONG Y P, et al. Production of high affinity monoclonal antibody and development of indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for gentamicin residue in animal tissues[J]. Food Chem, 2023, 400: 134067.
- [28] WANG S, XU B, ZHANG Y, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney [J]. Meat Sci, 2009, 82(1): 53-58.
- [29] HENDRICKSON O D, BYZOVA N A, ZVEREVA E A, et al. Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in foodstuffs[J]. J Food Sci Technol, 2021, 58(1): 292-301.