

蜂蜜中氯霉素残留量测定的不确定度评估

黄超群 刘海山 谢文 朱晓雨 沃柏林

(浙江出入境检验检疫局,杭州 310012)

奚君阳

(浙江立德产品技术有限公司,杭州 310012)

摘要 按照 SN/T 1864 - 2007《进出口动物源食品中氯霉素残留量的检测方法 第2部分:液相色谱串联质谱法》对蜂蜜中氯霉素残留量进行分析。通过建立数学模型,对测量结果的各不确定度来源,如标准使用液、内标、回归方程、方法重复性等引入的不确定度分量及其灵敏系数进行分析和量化。当蜂蜜中氯霉素残留量为 0.108 μg/kg 时,扩展不确定度为 0.012 μg/kg($k=2$)。

关键词 不确定度 灵敏系数 氯霉素 蜂蜜 液相色谱串联质谱法

氯霉素是一种人工合成的广谱抗生素,能引起人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症、新生儿灰色综合症等疾病,尤其是氯霉素的低浓度药物残留会诱发致病菌的耐药性^[1,2]。食品中氯霉素的残留不但对人体造成危害,而且严重影响我国食品的出口,因此准确测定食品中氯霉素的残留量具有重要意义。

然而一切测量结果都不可避免地具有不确定度^[3]。不确定度是对测量结果可能误差的度量,也是定量说明测量结果质量的一个参数^[4,5]。一个完整的测量结果,除了给出被测量的最佳估计值之外,还应同时给出测量结果的不确定度。笔者按照 JJF 1059 - 1999 的规定,对液相色谱串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素残留量的不确定度来源进行分析。根据所建立的数学模型,对各个分量不确定度评估,结合各分量的灵敏系数,得到了方法对于本实验样品的不确定度。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱串联质谱仪: API4000 型,美国 AB 公司;

色谱柱: Agilent Eclipse XDB - C8, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 美国安捷伦公司;

天平: AE260 型, 感量 0.1 mg, 瑞士 Mettler 公司;

天平: DT300A 型, 感量 0.01 g, 江苏常熟长青仪器仪表厂;

氯霉素标准品: 纯度 (98.5 ± 0.5)%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;

D - 5 氯霉素标准品: 纯度 (98.5 ± 0.5)%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;

其它仪器试剂均符合 SN/T 1864 - 2007 要求。

1.2 实验方法

准确称取蜂蜜样品 5.00 g 置于 50 mL 离心管中, 加内标 D - 5 氯霉素工作液 0.10 mL 后, 加入 15 mL 水, 振荡 2 min。加乙酸乙酯 20 mL, 振荡 2 min, 以 4000 r/min 离心 3 min。转移上层乙酸乙酯到 100 mL 浓缩瓶中, 下层再加乙酸乙酯重复提取一次, 合并乙酸乙酯层, 浓缩至近干, 用 15 mL 水分次溶解残渣。洗涤液过 C₁₈ 固相萃取柱 (5 mL 甲醇 + 5 mL 水预洗), 再用 5 mL 甲醇 - 水 (体积比为 2:8) 淋洗, 负压抽干, 用 6 mL 甲醇洗脱, 加水定容至 10 mL, 过滤膜, 供 LC - MS/MS 测定。

2 数学模型

根据实验方法, 样品中氯霉素含量按式(1)计算。

$$\begin{aligned} w &= \frac{c_s V}{m} = \frac{xc_{ls} V}{m} = \frac{(y - b)c_{ls} V}{ma} \\ &= \frac{(y - b)c'_{ls} V'}{ma} \end{aligned} \quad (1)$$

式中: w —— 样品中氯霉素的含量, μg/kg;

c_s —— 样液中氯霉素的浓度, ng/mL;

V —— 样品最终定容体积, mL;

m —— 样品称样量, g;

x —— 由标准曲线求得样液中氯霉素和内标 D - 5 氯霉素的浓度比;

c_{ls} —— 样液中内标的浓度, ng/mL;

y —— 氯霉素和内标的峰面积之比;

a —— 斜率;

b —— 截距;

c'_{ls} —— 内标工作液的浓度, ng/mL;

V' —— 加入样品中内标工作液的体积, mL。

3 合成标准不确定度和各分量灵敏系数

根据式(1), 蜂蜜中氯霉素含量测定的合成标准不确定度按式(2)计算:

$$u(w) = [c^2(y)u^2(y) + c^2(a)u^2(a) + c^2(b)u^2(b) + c^2(c'_{ls})u^2(c'_{ls}) + c^2(V')u^2(V') + c^2(m)u^2(m)]^{1/2} \quad (2)$$

各分量灵敏系数按式(3)计算:

$$\begin{aligned} c(y) &= \frac{c'_{ls}V'}{ma}; \quad c(a) = -\frac{(y-b)c'_{ls}V}{ma^2} \\ c(b) &= -\frac{c'_{ls}V'}{ma}; \quad c(c'_{ls}) = \frac{(y-b)V}{ma} \\ c(V) &= \frac{(y-b)c'_{ls}}{ma} \\ c(m) &= -\frac{(y-b)c'_{ls}V'}{m^2a} \end{aligned} \quad (3)$$

4 不确定度的评估

4.1 氯霉素和内标峰面积之比的不确定度 $u(y)$

样液中氯霉素和内标峰面积之比通过实验可以直接读取, 与线性回归无关, 其不确定度主要来源于实验过程中方法精密度、人员操作、试剂、污染因子和损失因子等所导致的峰面积之比的变动性。由此可见, 不确定度 $u(y)$ 很难精确评估, 因此以 A 类评定为主, B 类评定为辅, 根据实验方法测定 n 个平行样品, 得到 n 个仪器响应值 $y_{m,i}$ ($i=1, 2, \dots, n$)。对 n 次平行实验结果进行统计运算, 其标准偏差 $s(y)$ 作为不确定度 $u(y)$, 包含了以上变动性所导致的不确定度。

$$u(y) = s(y) = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (y_{m,i} - \bar{y}_m)^2} \quad (4)$$

式中: $\bar{y}_m = \sum_{i=1}^n y_{m,i}/n$

实验中, 测定了 10 个平行样品, 实验数据及计算结果见表 1。

表 1 平行实验数据及计算结果

$y_{m,i}$	y_m	$s(y)$
0.344 0.357 0.335 0.353 0.348 0.366 0.338 0.367 0.346 0.347	0.350	3.39×10^{-3}

将表 1 数据代入式(4), 计算得:

$$u(y) = 3.39 \times 10^{-3}$$

4.2 斜率 a 及截距 b 的标准不确定度 $u(a)、u(b)$

上述的数学模型是在假设回归方程为 $y = ax + b$ 前提下建立的。斜率和截距的不确定度主要包括由每个实验点的不确定度和实验点相对最佳拟合直

线的分散性所引起的不确定度。对于每一个 x_i ($i=1, 2, \dots, N$) 平行测定 j 次得到 y_{ij} ($j=1, 2, \dots, M$), 回归方程的斜率、截距可近似按如下计算^[6]:

首先由回归方程得到的 $y_i = ax_i + b$ 与相应 y_{ij} 之差按贝塞尔公式求出其标准差 $s(y_i)$:

$$s(y_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (y_{ij} - y_i)^2}{NM - 2}} \quad (5)$$

式中: y_{ij} —— 仪器上所得被测物与内标峰面积之比;

y_i —— 对应 x_i 的回归方程计算值;

N —— 测量点数目;

M —— 测量点重复测量次数。

由式(6)、(7)得到 a, b 的不确定度:

$$u(a) = s(y) \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

$$u(b) = s(y) \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{NM \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7)$$

式中: $\bar{x} = \sum_{i=1}^N x_i/N$ 。

配制氯霉素浓度为 0.025、0.05、0.2、0.4、0.6 ng/mL, 内标浓度为 0.1 ng/mL 的标准溶液, 测定氯霉素与内标峰面积之比 y , 拟合方程为 $y = 0.7409x - 0.0496$ ($r = 0.9996$), 所得数据和计算结果如表 2 所示。

表 2 线性回归测定结果及拟合方程计算结果

x_i	y_{ij}	\bar{y}_{ij}	由拟合方程计算所得 y_i
0.25	0.165 0.154 0.161	0.160	0.136
0.50	0.311 0.342 0.327	0.327	0.321
2.0	1.389 1.456 1.442	1.429	1.432
4.0	2.838 2.836 2.827	2.834	2.914
6.0	4.419 4.419 4.509	4.449	4.396

由式(6)、(7)计算得到: $u(a) = 0.0111$; $u(b) = 0.0215$ 。

4.3 内标工作液浓度 c'_{ls} 的不确定度 $u(c'_{ls})$

由于内标是 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 D-5 氯霉素储备液, 因此内标工作液的不确定度由两部分构成: 一部分来自内标定值引入的不确定度; 另一部分是由内标储备液配制工作液引入的不确定度。

(1) 内标定值引入的相对标准不确定度 $u_{r,ls}$

证书给定的定值最大允差为 $\pm 1.0\%$, 按照均匀分布, $u_{r,ls} = 1.0\%/\sqrt{3} = 0.577\%$ 。

(2) 配制内标工作液引入的相对标准不确定度 $u_{r,Is}(f)$

内标工作液按如下步骤配制: 移取 1.0 mL 内标储备液, 定容至 50 mL, 配成 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标中间液; 移取 0.25 mL 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准液, 定容至 50 mL, 配成 10 ng/mL 的内标工作液, 稀释因子 f_1, f_2 分别为 50 和 200。

①由 1.0 mL 移液管引入的相对标准不确定度 $u_r(1.0)$

体积的不确定分量 $u_{r,1}(1.0)$: A 级 1.0 mL 分度吸量管示值允差为 $\pm 0.008 \text{ mL}$, 按均匀分布, $u_{r,1}(1.0) = 0.008 / (1.0 \times \sqrt{3}) = 0.462\%$ 。

充满液体至刻度的变动性引入的不确定度分量 $u_{r,2}(1.0)$: 移取 1.0 mL 溶液 6 次, 称量, 得 6 个质量数据, 忽略称量的微小误差, 得 $u_{r,2}(1.0) = 0.125\%$ 。

由容量瓶校准温度与使用温度差别引入的不确定度分量 $u_{r,3}(1.0)$: 20°C 时水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/\text{°C}$, 温差为 $\pm 3\text{°C}$, 按均匀分布, 则 $u_{r,3}(1.0) = 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3} = 0.036\%$ 。

以上不确定度分量不相关, 则: $u_r(1.0) = \sqrt{u_{r,1}^2(1.0) + u_{r,2}^2(1.0) + u_{r,3}^2(1.0)} = 0.480\%$ 。

②由 50 mL 容量瓶引入的相对标准不确定度 $u_r(50)$

50 mL A 级单标线容量瓶的最大容量允差为 $\pm 0.05 \text{ mL}$, 按均匀分布, 计算方法同①, 得 $u_r(50) = \sqrt{(0.058\%)^2 + (0.010\%)^2 + (0.036\%)^2} = 0.069\%$ 。

③由 0.5 mL 移液管引起的相对标准不确定度 $u_r(0.5)$

0.5 mL A 级分度吸量管的最大允差为 $\pm 0.005 \text{ mL}$, 按均匀分布, 计算方法同①, 得 $u_r(0.5) = \sqrt{(1.155\%)^2 + (0.415\%)^2 + (0.036\%)^2} = 1.228\%$ 。

由以上数据得:

$$u_{r,Is}(f) = \sqrt{u_r^2(1.0) + 2u_r^2(50) + u_r^2(0.5)} = 1.322\%$$

$$u(c'_{Is}) = c'_{Is} u_r(c'_{Is}) = c'_{Is} \sqrt{u_{r,Is}^2 + u_{r,Is}^2(f)} = 0.1442 \text{ ng/mL}$$

4.4 加入样品中内标工作液体积 V' 的标准不确定度 $u(V')$

样品中加入内标工作液的体积 V' 为 0.10 mL, 0.5 mL 移液管的最大允差为 $\pm 0.005 \text{ mL}$, 计算方法同 4.3(2) 中①, 按均匀分布, 得 $u(V') = 0.0013 \text{ mL}$ 。

4.5 样品质量 m 的标准不确定度 $u(m)$

样品质量 m 的标准不确定度包含两个分量: 天

平定值引入的不确定度 $u(m_1)$ 以及重复称样误差引入的不确定度 $u(m_2)$ 。

根据天平的扩展不确定度 $U = 0.01$, 取 $k = 2$, 则 $u(m_1) = 0.01/2 = 0.005 \text{ g}$ 。同时, 用砝码在天平上称量 9 次, 极差 R 为 0.01 g, 查表得到 $C = 2.97$, 用极差法计算 $u(m_2)$:

$$u(m_2) = \frac{R}{\sqrt{nC}} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ g}$$

因此, $u(m) \approx 0.005 \text{ g}$

5 合成标准不确定度及扩展不确定度

5.1 合成标准不确定度 $u(w)$

实验测得样品中氯霉素和内标峰面积之比 y_m 为 0.350。由此根据式(1), 得到样品中氯霉素含量 w 为 0.108 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 同时根据式(3), 得到各不确定度分量的灵敏系数如表 3 所示。

表 3 各标准不确定度分量及其灵敏系数

量	量值	标准不确定度	灵敏系数	不确定度分量/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
y	0.350	3.39×10^{-3}	0.270	9.15×10^{-4}
a	0.7409	0.0111	-0.146	1.62×10^{-3}
b	-0.0496	0.0215	-0.270	5.8×10^{-3}
c'_{Is}	10.0 ng/mL	0.1442 ng/mL	0.0108	1.56×10^{-3}
V'	0.100 mL	0.0013 mL	1.08	1.40×10^{-3}
m	5.00 g	0.005 g	-0.0216	1.08×10^{-4}

将表 2 数据代入(2)式, 得 $u(w) = 0.006 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 扩展标准不确定度

取 $k = 2$, 扩展不确定度 $U = ku(w) = 0.012 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

6 结果报告

根据 SN/T 1864 - 2007 方法测定, 样品中氯霉素结果为 $(0.108 \pm 0.012) \mu\text{g}/\text{kg}, k = 2$ 。

参 考 文 献

- [1] Rodziewicz L, Zawadzka I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography - elektrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2008 (75): 846 - 850.
- [2] 王新丽. LC - MS/MS 法测定鱼肉中氯霉素残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 456 - 457.
- [3] JJF 1059 - 1999 测量不确定度评定与表示[S].
- [4] Vicki J Barwick. Sources of uncertainty in gas chromatography and high - performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1999(849): 13 - 33.
- [5] Signe Leito, Kadi Molder, Allan Kunnapas, et al. Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influ-

ence of various uncertainty sources [J]. Journal of Chromatography A, 2006(1121):56-63.

[6] 朱绍棠, 徐友宣, 吴侔天, 等. 用 HPLC 法测定咖啡因的不确定度 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(5):88-90.

EVALUATION OF THE UNCERTAINTY IN THE DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN HONEY

Huang Chaoqun, Liu Haishan, Xie Wen, Zhu Xiaoyu, Wo Bolin

(Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310012, China)

Xi Junyang

(Zhejiang LEAD Product Technique Co. Ltd, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT The chloramphenicol residues in honey was determined by SN/T 1864-2007 Determination of Chloramphenicol Residue in Animal-Derived Food for Import and Export; LC-MS/MS method. According to the mathematic model, the uncertainties induced by standard solution, internal standard, regression equation, method repeatability and the sensitivity coefficient were analyzed and quantified. The expanded uncertainty was 0.012 μg/kg with 0.108 μg/kg of chloramphenicol content in the sample.

KEYWORDS uncertainty, sensitivity coefficient, chloramphenicol, honey, LC-MS/MS

我国仪器仪表企业承受力好于预期

仪器仪表作为现代化大型重点成套装备、国防建设技术装备的重要组成部分和信息产业的源头,是信息化带动工业化的重要纽带,应用领域覆盖了工业、农业、交通、科技、环保、国防、人民生活等各方面,对国民经济有巨大倍增和拉动作用,因此该行业的发展引人关注。2009年以来,面对世界金融危机的影响,我国仪器仪表行业的产销增幅虽然再度大幅回落,但在全行业的共同努力下,已走出低谷,实现了平稳回升与发展。

在仪器仪表行业协会不久前召开的五届四次理事(扩大)会议上,奚家成分析了该行业2009年的运行及发展态势。

“自2003年以来,行业可以说是做了一次高低温试验,”奚家成说:“在行业高速增长、外资企业到处建厂大肆进军中国市场的情况下,本土企业没有败下来;在行业增速下降、需求剧变、利润增幅大落大起之时,本土企业恢复状况比外资企业好。”尽管如此,2010年的发展前景仍不容乐观,奚家成提醒说。

国产化的环境尚未根本改善,行业大发展的条件尚未成熟,创新突破有星火之亮,尚无燎原之势,不是所有企业都在产业化、技术突破上有进展,而且行业联合重组举步维艰,有国际性竞争力的企业尚在孕育中。

“我们要在国际上有竞争力,一定要有具有一定规模的企业作为领头羊,虽已是共识,但进展缓慢。”(高晟)

中国急需提升生命科学仪器研发能力

中国科学院广州生物医药与健康研究院院长裴端卿教授不久前会见中新社广东分社社长顾立军时表示,中国急需提升科研仪器的设计能力。

中国科学院有优秀的学生、优秀的科学家,而最可惜的是大量实验仪器不是中国制造的,实验室需要从美国进口大量的科研仪器。中国科学院广州生物院进口的科研仪器近1.9亿元,估计全院科研仪器所需达5.6亿元。若全部仪器

由中国研发设计,不仅会节省大量经费,而且能够更好地推进研究的进展。

生命科学是先锋的科学,是至关重要的科学。中国研究生命科学的科研仪器是进口的,也就是说“枪支”是进口的。科学家用进口的“枪支”做装备来打仗,很难达到全世界的最顶尖水平。中国亟需提升科研仪器设计能力,自己设计和生产科研仪器,进而取得科研战役的胜利。(高卓)

我国烟草X射线检测标准实现ISO“零”突破

不久前,由我国烟草行业制定和提交的第一个国际标准项目ISO12030“烟草及烟草制品—箱内片烟密度偏差率的无损检测—电离辐射法”正式被国际标准化组织(ISO)批准发布,目前已进入国际标准的印刷出版阶段,提前一年完成了烟草行业国际标准“零”的突破计划。

该项目由郑州烟草研究院作为召集人,中国烟草标准化研究中心和工艺重点实验室以及中国烟草机械集团有限责任公司、秦皇岛烟草机械有限责任公司、天昌国际烟草有限责任公司等有关单位具体承担研究、开发、试验工作。在国家烟草专卖局、总公司领导的高度重视和有关部门的积极组织协调以及国家标准化管理委员会等行业内外单位的大力支持下,项目组经过2年多的不懈努力,认真研究和严格遵守国际规则,广泛征求国内外意见,努力与德、法、英、日、印、韩等国专家进行沟通和协调,历经波折,数易其稿,不断完善,最终获得国际标准化组织烟草及烟草制品技术委员会(ISO/TC126)28个成员国的一致认可并获得通过。

该标准首次提出了箱内片烟密度偏差率(DVR)的无损检测方法(X射线检测方法),并研制出了科学先进、成熟实用的仪器设备,将成为国际片烟贸易活动中共同遵守的一个准则。这一标准的通过和颁布,实现了我国烟草行业制定国际标准“零”的突破,也是首个由亚洲国家提出并获得通过的与烟草相关的国际标准,对提高箱内片烟均匀分布程度、减少片烟霉变损失具有重要的理论和实用价值,有助于扩大我国烟草行业的国际交流与合作、促进科研水平的提升。

(高卓)