

高效液相色谱法测定鸡肉中噁喹酸残留量的测量不确定度评定

林小莉, 董艳峰, 于静泉
(哈尔滨市兽药饲料监察所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 运用测量不确定度的基本方法和程序, 建立高效液相色谱法测定鸡肉中噁喹酸残留量的测量不确定度评定的数学模型, 对测量过程中的不确定度来源进行逐项分析和合成, 得出高效液相色谱法测定鸡肉中噁喹酸残留量的不确定度结果, 当求得鸡肉中噁喹酸的残留量为 $78.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 扩展不确定度为 $3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词: 测量不确定度; HPLC 法; 噁喹酸; 评定

Assessment of Uncertainty in HPLC Analysis of Oxolinic Acid Residue in Chicken

LIN Xiao-li, DONG Yan-feng, YU Jing-quan
(Institute of Veterinary Drug and Food Control in Harbin, Harbin 150070, China)

Abstract: Based on the basic method and procedure for assessment of uncertainty, a mathematical model was established to assess the uncertainty of HPLC analysis of oxolinic acid residue in chicken. Factors contributing to the uncertainty were investigated by termwise analyzing and synthesizing the sources. The oxolinic acid residue in test portion of chicken was $78.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, and the expanded uncertainty was calculated as being $3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: uncertainty; HPLC; oxolinic acid; assessment

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0219-04

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性, 是与测量结果相联系的参数^[1]。测量结果的可用性很大程度上取决于其不确定度的大小, 测量结果必须附有不确定度说明才是完整并有意义的^[2]。中国合格评定国家认可委员会已明确提出要求实验室采用测量不确定度描述测量结果质量^[2]。本实验拟运用测量不确定度的基本方法和程序, 分析高效液相色谱法测定鸡肉中噁喹酸残留量的测量不确定度的各种因素, 以期建立数学模型, 并合成计算不确定度。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鸡肉样品 中国兽医药品监察所。

噁喹酸对照品(纯度 99.0%) 中国兽医药品监察所; 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

Breeze 型高效液相色谱仪(1525 泵, 474 荧光检测器, 717 自动进样器) 美国 Waters 公司; AB265-S 型

分析天平 瑞士 Mettler 公司; AR2140 型分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司制造; T18 型匀浆机 德国 IKA 公司; 固相萃取柱 C_{18} (100mg/ml) Varian 公司。

1.2 噁喹酸的残留检测方法

采用农业部中国兽医药品监察所组织的实验室间比对所采用的方法: 动物源食品中噁喹酸的残留检测方法——高效液相色谱法^[3]。

1.3 样品测定

取鸡肌肉组织样品搅碎, 准确称取 2.00g 后, 置 30ml 匀浆杯中, 加磷酸盐缓冲溶液 10.0ml, 10000r/min 匀浆 1min。匀浆液转入离心管, 中速振荡 5min, 8000r/min 离心 10min, 取上清液。用磷酸盐缓冲溶液 10.0ml 洗刀头及匀浆杯, 转入 50ml 离心管, 洗残渣, 搅匀, 中速振荡 5min, 8000r/min 离心 10min。合并两次上清液, 混匀, 备用。

固相萃取柱依次用甲醇、水各 2ml 预洗。预洗完毕后取备用液 5.0ml 过柱, 用水 1ml 淋洗, 挤干。用流

收稿日期: 2008-11-05

作者简介: 林小莉(1966—), 女, 高级工程师, 本科, 主要从事兽药饮料监督检测研究。

E-mail: y84300879@126.com

动相 2.0ml 洗脱, 挤干, 收集洗脱液, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为试样溶液, 上机测定。

空白试样、阳性添加试样提取和净化采用相同方法操作, 采用保留时间定性外标法以峰面积计算定量。

1.4 对照品溶液的制备

准备称取噻啉酸对照品 49.92mg, 置 50ml 量瓶中, 加 0.03mol/L 氢氧化钠溶液稀释, 配制成 998.4 $\mu\text{g/ml}$ 的标准储备液。精密量取 0.5ml, 置 50ml 量瓶中, 用乙腈稀释, 再精密量取 5ml 置 50ml 量瓶中, 用乙腈稀释, 即得 0.9984 $\mu\text{g/ml}$ 的噻啉酸标准工作液。精密量取 2.5ml 置于 50ml 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 制得 49.92ng/ml 的噻啉酸对照溶液。

1.5 液相色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱(150mm \times 4.6mm, 5 μm); 流动相: 0.02mol/L 磷酸溶液 - 乙腈 - 四氢呋喃(69:16:15, V/V); 流速: 0.8ml/min; 柱温: 室温; 荧光检测器; 检测波长: 激发波长 325nm; 发射波长 369nm; 进样量 20 μl 。

1.6 定量数学模型

$$X = \frac{A C_s V_1 V_3}{A_s V_2 m}$$

式中: X 为供试品中噻啉酸的残留量($\mu\text{g/kg}$); C_s 为对照品的浓度(ng/ml); A 为供试品的峰面积; A_s 为对照品的峰面积; V_1 为提取用磷酸盐缓冲液的总体积(ml); V_2 为过 C_{18} 固相萃取柱所用上清液体积(ml); V_3 为洗脱液总体积(ml); m 为供试品的称样量(g)。

1.7 测量不确定度的来源分析

从检测过程和数学模型分析, 高效液相色谱法测定鸡肉中噻啉酸残留量的测量不确定度主要来源于对照品溶液的浓度、样品的峰面积、对照品的峰面积、样品称量、测量重复性、定容体积、样品处理操作过程的差异等几个方面^[4]。

2 结果与分析

2.1 对照品的浓度 C_s 引起的标准不确定度 $u(C_s)$

对照品的浓度标准不确定度 $u(C_s)$ 来源于对照品的称量, 对照品溶液配制过程中的定容、稀释等, 需分别评定各不确定度分量后合成(对照品的品质证书未提供不确定度, 根据经验, 对照品纯度代入的不确定度分量较小, 暂不考虑)。

2.1.1 对照品的称量引起的标准不确定度 $u(m_s)$

精密称取噻啉酸对照品 49.92mg, 根据电子天平检定证书, $0 \leq m \leq 5\text{g}$ 天平最大允许误差为 $\pm 0.03\text{mg}$, 按均匀分布考虑^[4], 则得:

$$u_1(m_s) = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173\text{mg}$$

重复性误差为 $\pm 0.05\text{mg}$, 则得:

$$u_2(m_s) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289\text{mg}$$

天平校准的标准不确定度为:

$$u(m_s) = \sqrt{[u_1(m_s)]^2 + [u_2(m_s)]^2} = 0.0337$$

相对不确定度:

$$u_{\text{rel}}(m_s) = \frac{u(m_s)}{m_s} = 0.000675$$

2.1.2 对照品溶液配制过程中定容稀释引起的标准不确定度 $u(V_s)$

2.1.2.1 对照品溶液配制过程中量器校准引起的标准不确定度 $u_1(V_s)$

对照品溶液的配制过程中使用了一系列玻璃量器, 根据检定规程^[5], 均有相应的最大允许误差, 按均匀分布考虑 $k = \sqrt{3}$, 分别计算标准不确定度(表 1)。

表 1 量器校准引起的标准不确定度

Table 1 Standard uncertainty caused by calibration of measuring vessels during the preparation of oxolinic acid standard solution

玻璃量具	最大允许误差(ml)	标准不确定度(ml)
50ml 容量瓶 A 级(使用 4 次)	± 0.05	$u_1(V_{s50}) = 0.0289$
0.5ml 刻度吸管 A 级	± 0.005	$u_1(V_{s0.5}) = 0.00289$
5ml 刻度吸管 A 级(吸 5ml)	± 0.025	$u_1(V_{s5}) = 0.0144$
5ml 刻度吸管 A 级(吸 2.5ml)	± 0.025	$u_1(V_{s2.5}) = 0.0144$

2.1.2.2 对照品溶液配制过程中人员读数引起的标准不确定度 $u_2(V_s)$

根据《化学分析中不确定度评估指南》中有关数据^[6], 人员读数允许有 1% 的不确定性即 $0.01V_s$, 按三角分布考虑 $k = \sqrt{6}$ ^[4], 分别计算标准不确定度(表 2)。

表 2 人员读数引起的标准不确定度

Table 2 Standard uncertainty caused by personnel numerical reading during the preparation of oxolinic acid standard solution

玻璃量具	人员读数不准确度(ml)	标准不确定度(ml)
50ml 容量瓶 A 级(使用 4 次)	0.5	$u_2(V_{s50}) = 0.204$
0.5ml 刻度吸管 A 级	0.005	$u_2(V_{s0.5}) = 0.00204$
5ml 刻度吸管 A 级(吸 5ml)	0.05	$u_2(V_{s5}) = 0.0204$
5ml 刻度吸管 A 级(吸 2.5ml)	0.05	$u_2(V_{s2.5}) = 0.0204$

2.1.2.3 对照品溶液配制过程中定容稀释引起的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_s)$ (表 3)

表 3 定容稀释引起的相对标准不确定度

Table 3 Standard uncertainty caused by constant volume dilution during the preparation of oxolinic acid standard solution

玻璃量具	标准不确定度(ml)	相对标准不确定度
50ml 容量瓶 A 级(使用 4 次)	$\sqrt{0.0289^2 + 0.204^2} = 0.206$	$u_{\text{rel}}(V_{s50}) = 0.00412$
0.5ml 刻度吸管	$\sqrt{0.00289^2 + 0.00204^2} = 0.00354$	$u_{\text{rel}}(V_{s0.5}) = 0.00708$
5ml 刻度吸管 A 级(吸 5ml)	$\sqrt{0.0144^2 + 0.0204^2} = 0.0250$	$u_{\text{rel}}(V_{s5}) = 0.0050$
5ml 刻度吸管 A 级(吸 2.5ml)	$\sqrt{0.0144^2 + 0.0204^2} = 0.0250$	$u_{\text{rel}}(V_{s2.5}) = 0.010$

2.1.3 对照品浓度 C_s 引起的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_s)$

$u_{rel}(m_s)$ 、 $u_{rel}(V_{S/50})$ 、 $u_{rel}(V_{S/0.5})$ 、 $u_{rel}(V_{S/5})$ 、 $u_{rel}(V_{S/2.5})$ 互相独立不相关, 故对照品的浓度 C_s 引起的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(C_s) = \frac{u(C_s)}{C_s} = \frac{\sqrt{[u_{rel}(m_s)]^2 + [u_{rel}(V_{S/50})]^2 \times 4 + [u_{rel}(V_{S/0.5})]^2 + [u_{rel}(V_{S/5})]^2 + [u_{rel}(V_{S/2.5})]^2}}{C_s}$$

$$= \sqrt{0.000675^2 + 0.00412^2 \times 4 + 0.00708^2 + 0.0050^2 + 0.010^2} = 0.0156$$

2.2 供试品的峰面积 A 引起的标准不确定度 $u(A)$

供试品的峰面积标准不确定度 $u(A)$ 主要来源于高效液相色谱仪的定量重复性。根据高效液相色谱仪的检定证书给出的定量重复性为 1.2%, 按矩形分布 $k=3^{[4]}$, 则相对不确定度为:

$$u_{rel}(A) = \frac{1.2\%}{\sqrt{3}} = 0.00693$$

2.3 对照品的峰面积 A_s 引起的标准不确定度 $u(A_s)$

按 2.2 同法分析, 可得其相对不确定度 $u_{rel}(A_s) = 0.00693$

2.4 样品提取、净化、洗脱过程中体积 V 引起的标准不确定度 $u(V)$ 及相对标准不确定度 $u_{rel}(V)$ 。

2.4.1 量器校准引起的标准不确定度 $u_1(V)$

样品提取、净化、洗脱过程中使用了一系列玻璃量器, 根据检定规程^[5], 均有最大允差, 按均匀分布考虑 $k=\sqrt{3}$, 分别计算标准不确定度(表 4)。

表 4 样品提取、净化、洗脱过程中量器校准引起的标准不确定度
Table 4 Standard uncertainty caused by calibration of measuring vessels in the processes of sample extraction, purification and elution

玻璃量器	最大允许误差(ml)	标准不确定度(ml)
10 ml 刻度吸管 A 级(使用 2 次)	± 0.05	$u_1(V_1) = 0.0289$
5 ml 刻度吸管 A 级	± 0.025	$u_1(V_2) = 0.0144$
2 ml 刻度吸管 A 级	± 0.012	$u_1(V_3) = 0.00693$

2.4.2 人员读数引起的标准不确定度 $u_2(V)$

按 2.1.2.2 节中同法分析, 可得标准不确定度(表 5)。

表 5 人员读数引起的标准不确定度

Table 5 Standard uncertainty caused by personnel numerical reading in the processes of sample extraction, purification and elution

玻璃量器	人员读数不准确度(ml)	标准不确定度(ml)
10ml 刻度吸管 A 级(使用 2 次)	0.1	$u_2(V_1) = 0.0408$
5ml 刻度吸管 A 级	0.05	$u_2(V_2) = 0.0204$
2ml 刻度吸管 A 级	0.02	$u_2(V_3) = 0.00816$

2.4.3 样品提取、净化、洗脱过程中体积 V 引起的相对标准不确定度

由表 6 可得: $u_{rel}(V) = \sqrt{[u_{rel}(V_1)]^2 \times 2 + [u_{rel}(V_2)]^2 + [u_{rel}(V_3)]^2}$

$$= \sqrt{0.0050^2 \times 2 + 0.0050^2 + 0.00535^2} = 0.0102$$

表 6 体积 V 引起的相对标准不确定度

Table 6 Standard uncertainty caused by volume measurement in the processes of sample extraction, purification and elution

玻璃量器	标准不确定度(ml)	相对标准不确定度
10 ml 刻度吸管 A 级(使用 2 次)	$\sqrt{0.0289^2 + 0.0408^2} = 0.050$	$u_{rel}(V_1) = 0.0050$
5 ml 刻度吸管 A 级	$\sqrt{0.0144^2 + 0.0204^2} = 0.0250$	$u_{rel}(V_2) = 0.0050$
2 ml 刻度吸管 A 级	$\sqrt{0.00693^2 + 0.00816^2} = 0.0107$	$u_{rel}(V_3) = 0.00535$

2.5 供试品的称样量 m 引起的标准不确定度 $u(m)$

称取供试品 2.00g, 根据电子天平检定证书, 天平最大允许误差为 ± 0.001g。按均匀分布考虑, 则得:

$$u_1(m) = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 0.000577g$$

重复性误差和四角误差为 ± 0.002g, 则

$$u_2(m) = \frac{0.002}{\sqrt{3}} = 0.00115g$$

天平校准的标准不确定度和相对标准不确定度为:

$$u(m) = \sqrt{[u_1(m)]^2 + [u_2(m)]^2 \times 2} = 0.00173g;$$

$$u_{rel}(m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.00173}{2.00} = 0.000865$$

2.6 供试品测量重复性引起的标准不确定度 $u(X)$

称取供试品二份, 分别测定, 测定结果见表 7。因测定次数较少, 采用极差法^[1]计算得:

$$u_{rel}(X) = \frac{0.88}{1.13 \times 2 \times 78.0} = 0.00706$$

表 7 测定结果

Table 7 Residue level of oxolinic acid in chicken sample analyzed by the HPLC method adopted in this study

供试品编号	测定结果(μg/g)	平均值(μg/g)	极差(μg/g)
1	77.56	78.0	0.88
2	78.44		

2.7 由加标回收率引起的标准不确定度 $u(R)$

样品的提取、净化、洗脱是一个非常复杂的过程, 难以评定, 采用在空白样品中添加回收实验的方法。回收率实验采用称取二份空白样品添加, 分别测定, 测定结果(表 8)。

表 8 加标回收率测定结果

Table 8 Recovery for oxolinic acid in spiked blank chicken sample

回收率实验编号	加标量(ng/g)	实测值(ng/g)	回收率(%)	平均值(%)	极差(%)
1	199.7	193.8	97.0	97.3	0.6
2		194.9	97.6		

因测定次数较少,采用极差法计算得:

$$u_{\text{rel}}(R) = \frac{0.6\%}{1.13 \times 2 \times 97.3\%} = 0.00386$$

2.8 合成标准不确定度及扩展不确定度
相对合成标准不确定度为:

$$\frac{u(X)}{X} = \sqrt{[u_{\text{rel}}(Cs)]^2 + [u_{\text{rel}}(A)]^2 + [u_{\text{rel}}(As)]^2 + [u_{\text{rel}}(V)]^2 + [u_{\text{rel}}(m)]^2 + [u_{\text{rel}}(X)]^2 + [u_{\text{rel}}(R)]^2}$$

$$= \sqrt{0.0156^2 + 0.00693^2 + 0.00693^2 + 0.0102^2 + 0.000865^2 + 0.00706^2 + 0.00386^2}$$

$$= 0.0226$$

实验所得鸡肉中噁唑酸的残留量为 $78.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, 则测量结果的合成标准不确定度为: $u(X) = 78.0 \times 0.0226 = 1.76 \mu\text{g}/\text{kg}$; 取包含因子 $k=2$, 则测量结果的扩展不确定度为: $U = 2u(X) = 2 \times 1.76 = 3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.9 测量结果表示

鸡肉中噁唑酸的残留量可表示为 $(78.0 \pm 3.5) \mu\text{g}/\text{kg}$, $k = 2$ 。

3 结论

通过对 HPLC 法测定鸡肉中噁唑酸残留量的测量不确定度的分析评定, 可以看出影响测量结果的不确定度分量主要是由对照品的浓度以及样品提取、净化、洗脱过程中体积, 因此测定过程中, 对这二方面应给予足够的重视, 从而保证检测结果的准确度和置信度。

参考文献:

- [1] 国家质量技术监督局. JJF1059—1999测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.
- [2] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南[S]. 北京: 中国计量出版社, 2003.
- [3] 农业部中国兽医药品监察所药残检验SOP. 动物源食品中噁唑酸的残留检测方法: 高效液相色谱法[S].
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1135—2005化学分析测量不确定度评定[S]. 北京: 中国计量出版社, 2005.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 196—2006常用玻璃量器[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [6] 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[S].